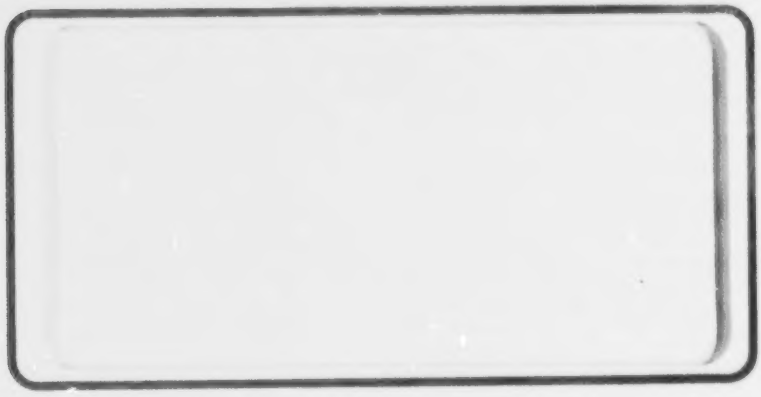
Statistics Canada Statistique Canada



Statistics Canada
Analytical Studies Branch

Research Paper Series

Canada

THE DISTRIBUTION OF THE FREQUENCY OF OCCURRENCE OF NUCLEOTIDE SUBSEQUENCES BASED ON THEIR OVERLAP CAPABILITY

by

Jane F. Gentleman and Ronald C. Mullin

No. 14

Social and Economic Studies Division
Statistics Canada
1988

The analysis presented in this paper is the responsibility of the author and does not necessarily represent the views or policies of Statistics Canada.

The Distribution of the Frequency of Occurrence of Nucleotide Subsequences, Based on Their Overlap Capability

Jane F. Gentleman
Statistics Canada, Social and Economic Studies Division
Ottawa, Ontario, Canada K1A 0T6

Ronald C. Mullin
University of Waterloo, Dept. of Combinatorics and Optimization
Waterloo, Ontario, Canada N2L 3G1

ABSTRACT

DNA's genetic code can be represented as an alphabetic sequence composed of the four letters A, C, G, and T, which represent the four types of nucleotides - adenylic, cytidylic, guanylic, and thymidylic acid - of which DNA is composed. Now that these sequences have been identified for many genes and are available in computer-readable form, scientists can analyze these data and search for patterns in an attempt to learn more about the regulatory functions of the gene. One area of study is that of the frequency of occurrence of specific nucleotide subsequences (e.g., ACAC) within part or all of a nucleotide sequence. This paper derives the probability distribution of the frequency of occurrence of a subsequence within a nucleotide sequence, under the hypothesis that the four nucleotides occur at random and with equal probability. This distribution is nontrivial because different subsequences have different "overlap capability." For example, the subsequence AAAA can occur up to 17 times in a sequence of length 20 (which would happen if the sequence were composed solely of A's), but the subsequence ACGT cannot occur more than 5 times in a sequence of length 20. Thus, the frequency distributions are different for each type of overlap capability. It is of interest to assess and compare the degree of nonrandomness for different subsequences or among different portions of a sequence; the existence and degree of nonrandomness may be related to the type and degree of functionality of a nucleotide (sub)sequence. Using the frequency distributions provided here, exact significance tests of the hypothesis of randomness can be performed. An approximate test is also described for use with long sequences; this can be used to test a more general null hypothesis of nucleotides occurring with unequal probabilities.

1. INTRODUCTION.

Genes are long, double-stranded, helical molecules of DNA. Each of the two strands contains a sequence of nucleotides - typically between 1,500 and 15,000 of them - and the two strands are loosely bound together by hydrogen bonds. A

Key words: DNA subsequences; nucleotide subsequences; overlap capability

nucleotide in DNA is identified according to which of four nitrogenous bases it contains: a purine base, adenine (A) or guanine (G), or a pyrimidine base, cytosine (C) or thymine (T). There is a one-to-one correspondence between nucleotides on opposite strands; an A, G, C, or T on one strand is weakly bonded to its complement, T, C, G, or A, respectively, on the other. DNA's so-called "genetic code" can thus be represented as a single alphabetic sequence composed of these four letters. It is by means of this code that the gene controls the formation of other substances in the cell (see, e.g., Guyton (1969)). Also, certain sequences of nucleotides form oncogenic genes which can initiate some forms of cancer.

Relatively recent advances in biochemistry have made it possible to determine the nucleotide sequences for large numbers of genes, and for intergenic material, which also consists of nucleotide sequences. Such data are now available in computer-readable form, so it is possible to look for and analyze patterns within sequences using statistical and statistical computing techniques. Scientists are now able to use pattern recognition algorithms to "learn more about the regulatory nature of the various genetic functional domains, and more about what it is that is recognized within those domains by the cellular hardware..." (Sadler, Waterman, and Smith (1983)). Weir (1985) provides a useful survey of new problems of statistical analysis which have arisen following advances in molecular genetics.

One area of study is that of the frequency of occurrence of specific short nucleotide subsequences (e.g., ACAC) within part or all of a nucleotide sequence. Maizel et al. (1981) concluded that, among the computer programs being widely used for nucleic acid analysis, "Most frequently used are programs that search for occurrences of short subsequences that are used by enzymes as signals to recognize, modify, and express nucleic acids, that determine the frequency and locations of short strings of nucleotides, and that translate nucleic acid sequences into amino acid sequences or complementary polynucleotide strands." Some examples of papers which deal with the analysis of subsequence frequencies are: Aquadro and Greenberg (1983), Gentleman et al. (1984), Grantham et al. (1981), Harr, Haggstrom, and Gustafsson (1983), Korn and Queen (1984), Nussinov (1984), Sadler et al. (1983), Smith and Burks (1983), Smith, Waterman, and Sadler (1983), Queen and Korn (1980), and Vass and Wilson (1984).

It is of interest to assess and compare the degree of nonrandomness for different subsequences or among different portions of a sequence; the existence and degree of nonrandomness may be related to the type and degree of func-

tionality of a nucleotide (sub)sequence. Orgel and Crick (1980) classified the DNA of higher organisms as falling into two classes, one specific and the other comparatively nonspecific. Regarding the latter, they noted that "there is a large amount of evidence which suggests, but does not prove, that much DNA in higher organisms is little better than junk." Vass and Wilson (1984) describe statistical tests for detecting nonrandom arrangements on a nucleotide strand. These tests "may be especially useful in the analysis of patterns in DNA sequences which may partly reflect the structure and function of the genes in which they are part." Shukla and Srivastava (1985) developed a test for sequence randomness based on the frequency of occurrence of a particular subsequence at two positions which are a fixed number of bases apart. They reasoned that "low probability of chance occurrence calls for further exloration...of...possible structural or functional significance, ...(whereas, if there is) a high probability of chance occurrence, then one has to exercise some caution before attaching any structural or functional role to that kind of...repeat."

Gentleman et al. (1984) gave two examples of how the occurrence of a subsequence in unexpectedly large numbers may provide information about structure or function: (1) This phenomenon may reflect the fact that that segment of DNA was originally formed by replication of smaller segments. Such replication might be exact initially, but might be altered with time. But in regions of the sequence where retention of function is necessary, exact repeats would be expected to occur. (2) A break in DNA usually occurs at different positions, from 3 to 10 nucleotides apart, on the two strands. When this happens, a gap is created on each strand opposite remaining nucleotides on the other strand. On each strand, to fill this gap, nucleotides complementary to their counterparts on the other strand are added, thus duplicating the subsequence on the other side of the break. The break itself is filled in. The occurrence of repeated subsequences may therefore identify locations where an insert has been introduced into the DNA sequence.

Relatively little is know about the specific functionality of DNA. The attempt to identify of nucleotide (sub)sequences of greater or lesser randomness is based in part on the concept that a higher degree of functionality may be indicated by a lower degree of randomness. The complementarity of the two strands of DNA permits each strand to act as a template on cell division to form two identical double stranded structures. As DNA reproduces itself, chance mutations may occur, so that DNA is subject to the forces of natural selection and evolution. Thus, a particular configuration in DNA that exists now may have

been favored by natural selection. (For further discussion of genetic evolution, see Doolittle and Sapienza (1980), Orgel and Crick (1980), and Forbes and Shadbolt-Forbes (1988).)

This paper derives the probability distribution of the frequency of occurrence of a subsequence within a nucleotide sequence, under the hypothesis that the four nucleotides occur at random and with equal probability. A general algorithm is provided for calculating this probability distribution, which depends on the sequence length, the subsequence length, and a property of the subsequence which will be termed "overlap capability". Explicit formulas are given for all subsequences of length 2-8. Access to these distributions permits the use of exact significance tests of the hypothesis of randomness. An approximate test is also provided for use when the sequence is long. The observed significance level of such tests measures the extent of the data's departure from the hypothesis, i.e., the degree of nonrandomness.

A null hypothesis of equiprobable occurrence of the different nucleotides is reasonable in the context of the present DNA structures having evolved from a "primordial soup" or "base pool" containing equal quantities of each base. This is discussed by Sege and Saxberg (1982), who provide a statistical test for the simultaneous comparison of several nucleotide subsequences. Their "null hypothesis which one seeks to reject" is that the observed data came by chance selection from a base pool with specified relative frequencies of A, C, G, and T. They describe three alternatives for choosing the four null probabilities:

> "(1) The abstract nucleotide pool is unlimited and therefore the distribution of nucleotides is effectively equal; (2) the sequences are drawn from a pool comprised of the nucleotide distribution typical of the species; or (3) the nucleotide pool for the class of sequences examined is well represented by the total distribution of nucleotides in the sequences themselves."

Sege and Saxberg then discuss the conditions under which each choice is appropriate:

> "The virtual pool selected will be a function of the question posed by the experimenter and the level of information desired. Clearly the most readily interpreted virtual pools are the even virtual pool (frequencies = 0.25) and the 'species/organism' virtual pool (average frequencies of bases for the species/organism). These virtual pools should serve as standards unless the investigator has sufficient reason to warrant

> another type (e.g., experimental virtual pool). When a non-standard virtual pool is used, its justification and the meaning of the resulting (significance levels) must be carefully considered."

The exact distributions provided in this paper can be used to test the first of Sege and Saxberg's alternatives, and the approximate test can be used to test any of the three alternatives.

A model in which the four types of nucleotides occur independently has been assumed by some researchers (e.g., those cited in Biggins and Cannings (1987, p. 521)), and hypothesized by others. In the latter case, the hypothesis has been accepted in numerous situations, particularly in the analysis of relatively short (sub)sequences. Garden (1980) fitted Markov chain models to three DNA/RNA sequences, finding that Markov models of order three, two, and zero fitted best. (In RNA, the pyrimidine uracil appears instead of thymine.) The zeroth-order model fitted a gene of length 1632. Fuchs (1980) speculated that the length of the sequence is directly related to the order, citing Garden's further results for subsequences to support this. Fuchs noted that "the majority of the 500-nucleotide segments were fitted well by a model of order zero or one, as expected for short sequences." He recommended two types of supplementary analyses: detection of anomalous regions in a sequence, and analysis of deviations between the observed and expected frequencies of nucleotide subsequences.

Section 2 below defines the concept of "overlap capability", a property of a subsequence which complicates the probability function for the frequency of occurrence of the subsequence. Section 3 derives the expectation and variance of this random variable. The probability function - which is different for each type of overlap capability - is derived in Section 4 (with further details in the Appendix). Section 5 provides examples, using a human genome sequence, of the use of the probability function in exact and approximate significance tests of randomness.

2. DEFINITION OF OVERLAP CAPABILITY.

Assume that the four nucleotides which make up a subsequence occur independently and with equal probability, so that the probability p of the occurrence of a subsequence of length L is $(1/4)^L$. Let the random variable X be the frequency of occurrence of a nucleotide subsequence of length L within a nucleotide sequence of length M. A subsequence "occurs at position i" if it is found to begin at position i. Then $n = M-L+1$ is the maximum value achievable by X. Let $f(x;L,M,Q)$ be the probability function of X. This depends not only on

the scalars L and M, but also on the vector Q, which represents the "overlap capability" of the specific subsequence. As a simple example, the subsequence AAAA can occur between 0 and 17 times within a sequence of length 20. The subsequence ACAC cannot occur more than 9 times in a sequence of length 20 because it has less overlap capability. The subsequence ACGT has no overlap capability except in the trivial case when it is superimposed on itself, so it cannot occur more than 5 times. Thus, $f(x;L,M,Q)$ cannot be treated as a binomial distribution involving independent trials.

Define overlap capability as follows: Let S be a given subsequence and $S_1, S_2, \ldots, S_L$ be letters representing its L nucleotides from left to right. Then represent the overlap capability Q of S as a binary sequence $Q_1, Q_2, \ldots, Q_L$ such that $Q_i=1$ if it is possible for the subsequence's first i letters to overlap its last i letters, and $Q_i=0$ otherwise (for $i=1,\ldots,L$). Specifically, $Q_i=1$ if $S_k=S_{k+L-i}$ for $k=1,\ldots,i$, and $Q_i=0$ otherwise (for $i=1,\ldots,L$). Obviously, $Q_L=1$ because a subsequence can always overlap its entire self. For example, the subsequence ACAC has overlap capability 0,1,0,1, and the subsequence AAAC has overlap capability 0,0,0,1. Clearly, many subsequences can have the same overlap capability. On the other hand, not all 2^L possible binary sequences of length L yield possible Q's, due to interrelationships among the elements of Q: for example, no subsequence can have overlap capability 1,0,1,1 (because $Q_3=1$ implies that all elements of S are the same, but $Q_2=0$ implies the existence of some inequalities among them). For L=2 to L=8, for example, there are, respectively, only 2, 3, 4, 6, 8, 10, and 13 possible overlap capabilities. An algorithm that can be used to test a binary sequence to determine if it is a possible overlap capability is given in Guibas and Odlyzko (1981). An algorithm to generate all possible overlap capabilties given L is described in Gentleman and Mullin (1987).

The above model can be described in the terminology of Markov chains. Feller (1950, p. 376, Problem 1) descibed a special case of this situation (for L=2 and a two-letter alphabet) as a four-state, first-order Markov process. That approach generalizes here to an a^L-state, (L-1)-order Markov process (where a is the number of letters in the genetic alphabet). Then in particular, the transition probability of the occurrence of S, given that S occurred L-k positions before, is $p^{L-k}Q_k$, for $k=1,\ldots,L-1$ (where $p=(1/a)^L$). (This is easily further generalized to the case of letters having unequal probabilities.)

Overlap capability enters into the discussion by Biggins and Cannings (1987) of restriction enzymes which cut DNA sequences whenever certain specific

subsequences occur. If one of these subsequences overlaps itself or another of the recognizable subsequences, the cut occurs only at the site of the "earlier" occurrence. For other examples of analyses incorporating the concept of overlap capability, see Shukla and Srivastava (1985) and Karlin and Ost (1987).

3. DERIVATION OF EXPECTATION AND VARIANCE

The expectation of X is, perhaps counterintuitively, independent of the subsequence's overlap capability (Q). The variance depends on Q and, as would be expected, is larger for subsequences with a "higher degree" of overlap capability. For example, if the sequence length M=20 and the subsequence length L=4, then for the subsequences AAAA, ACAC, and ACGT, E(X)=.07 and V(X) is .11, .07, and .06, respectively.

To derive the expectation and variance of X, assume that $M \geq L$, and define indicator variables $Y_1, Y_2, \ldots, Y_n$ (where n=M-L+1) such that $Y_i=1$ if the subsequence S occurs at position i, and $Y_i=0$ otherwise (for i=1,...,n).

Then $X = \sum_{i=1}^{n} Y_i$, so that

$E(X) = \sum_{i=1}^{n} E(Y_i)$. Since $E(Y_i) = (\frac{1}{4})^L = p$, $E(X) = np$, independent of Q, and

$$V(X) = \sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{n} \mathrm{Cov}(Y_i,Y_j) = \sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{n} E(Y_iY_j) - \sum_{i=1}^{n} E(Y_i) \sum_{j=1}^{n} E(Y_j)$$

$$= \sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{n} E(Y_iY_j) - n^2p^2 \qquad (1).$$

To obtain V(X), it is necessary to take account of the fact that the Y's are not in general independent of each other; covariances between Y's which are "near neighbors" depend on Q. To determine these covariances, quantities of the form $E(Y_iY_{i+k})$ must be calculated. This is just the probability that the subsequence occurs at both position i and position i+k. If $0 \leq k \leq \min(L-1,n-1)$, then $E(Y_iY_{i+k}) = Q_{L-k}(1/4)^{L+k} = pQ_{L-k}(1/4)^k$.

If $\min(L-1,n-1) < k < n$, Q is irrelevant and $E(Y_iY_{i+k}) = (1/4)^{2L} = p^2$.

There are n terms among the n^2 in $\sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{n} E(Y_iY_j)$ such that i=j.

Also, if $n > 1$ there are 2(n-k) terms such that j=i+k or i=j+k (for k=1,...,min(L-1,n-1)). If $n > L$, there are $2\sum_{k=1}^{n-L} k = (n-L)(n-L+1)$ remaining terms which do not depend on Q. Thus,

$$\sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{n} E(Y_iY_j) = np + p^2(n-L)(n-L+1) + 2p\sum_{k=1}^{\min(L-1,\,n-1)} (n-k)Q_{L-k}(1/4)^k,$$

so Eqn. (1) becomes

$$V(X) = np(1-np) + p^2(n-L)(n-L+1) + 2p\sum_{k=1}^{\min(L-1,\,n-1)} (n-k)Q_{L-k}(1/4)^k \qquad (2).$$

On the right hand side of Eqn. (2) and of the previous equation, the second term equals zero if $n \leq L$, and the third term equals zero if $n=1$. If $L=1$, the third term in Eqn. (2) equals zero, and $V(X)$ reduces, as it should, to the variance $np(1-p)$ of a binomial random variable.

The formulas for $E(X)$ and $V(X)$ can be generalized as follows for an arbitrary number a of letters in the alphabet, occurring independently with probabilities $p_1, p_2, \ldots, p_a$ (which sum to 1). Suppose the subsequence S consists of L letters with respective probabilities $p_{j_1}, p_{j_2}, \ldots, p_{j_L}$. Let $P_k = \prod_{m=1}^{k} p_{j_m}$ be the product of the probabilities of the first k letters in S. In particular, $P_L = \prod_{m=1}^{L} p_{j_m} = Pr(S)$. Then $E(X) = nP_L$, and Eqns. (1) and (2) may be generalized by substituting P_L for p, and P_k for $(1/4)^k$.

The contribution of Q to V(X) in Eqn. (2) motivates the following procedure for ranking subsequences in order of their degree of overlap capability: Let $\overline{Q}$ be the binary number constructed from the L elements of Q in reverse order. Then subsequence S_1 with overlap capability Q_1 has greater overlap capability than subsequence S_2 with overlap capability Q_2 if $\overline{Q}_1 > \overline{Q}_2$. Thus, for example, the following subsequences are listed in increasing order of overlap capability: ACGTT, ACGTA, ACGAC, AACAA, ACACA, AAAAA (for which $\overline{Q}$ = 10000, 10001, 10010, 10011, 10101, 11111, respectively). Using this ranking procedure, then for fixed L and $n > 1$, V(X) increases with the degree of overlap capability.

Examination of Eqn. (2) shows that for $n > L$, the maximum value of $V(X)$ (achieved when all elements of Q are equal to 1), is greater than the variance $np(1-p)$ of a binomial random variable, and the minimum $V(X)$ (achieved when all elements of Q except Q_L are equal to 0) is less than $np(1-p)$. As $n \to \infty$, $V(X)-np(1-p) \to 2np \sum_{k=1}^{L-1}(4^{-k}-p)$ if $Q=1,1,\ldots,1$, and $V(X)-np(1-p) \to -2(L-1)np^2$ if $Q=0,0,\ldots,0,1$. Thus, the difference between the maximum and minimum variance approaches $2np \sum_{k=1}^{L-1} 4^{-k}$ as $n \to \infty$. For example, these three limiting quantities are equal, respectively, to .023n, -.00781n, and .0313n for L=2, and to .00266n, -.0000916n, and .00256n for L=4.

4. DERIVATION OF THE PROBABILITY FUNCTION

Using combinatorial theory, an algebraic formula can be derived for the probability generating function of X. This requires an appropriate application, as described in the Appendix, of the combinatorial techniques in Goulden and Jackson (1983, Section 2.8.). From the probability generating function, an algebraic formula for $f(x;L,M,Q)$, recursive in x and M, can be obtained as shown below. A separate formula involving parameters L and M is required for each Q.

The probability generating function $P(u,v)$ for $f(x;L,M,Q)$ is

$$P(u,v) = \sum_{M=0}^{\infty} \sum_{x=0}^{\infty} f(x;L,M,Q) u^M v^x$$

$$= \frac{1-(v-1)h(u/4)}{[1-(v-1)h(u/4)](1-u)-(u/4)^L(v-1)} \qquad (3).$$

This formula involves the "prefix polynomial" $h(x)$, defined as

$h(x) = \sum_{k=1}^{L-1} x^{L-k} Q_k$. (Note that $h(p)$ is the sum of the L-1 transition probabilities described in Section 2.) In Eqn. (3), the "4", which appears three times, can be generalized to be the number of equiprobable letters of the alphabet. This also holds for Eqns. (4), (5), and (8) below.

$f(x;L,M,Q)$ is the coefficient of $u^M v^x$ in Eqn. (3). To obtain a formula for f, write the denominator of the right hand side of Eqn. (3) as 1-D, where

$$D = u - (u/4)^L + (u/4)^L v - (1-u+uv-v)h(u/4) \qquad (4).$$

Then multiply both sides of Eqn. (3) by 1-D and isolate P(u,v) on the left hand side to obtain

$$\sum_{M=0}^{\infty}\sum_{x=0}^{\infty} f(x;L,M,Q)u^M v^x = 1-(v-1)h(u/4) + D\sum_{M=0}^{\infty}\sum_{x=0}^{\infty} f(x;L,M,Q)u^M v^x \qquad (5).$$

If D is written as

$$D = \sum_{i=1}^{L}\sum_{j=0}^{1} C_{ij}u^i v^j$$

so that C_{ij} is the coefficient of $u^i v^j$ in Eqn. (4), then the coefficient of $u^M v^x$ in Eqn. (5) is

$$f(x;L,M,Q) = \sum_{i=1}^{L}\sum_{j=0}^{1} C_{ij}\, f(x-j;L,M-i,Q) \qquad (6).$$

This is obtained by applying the following boundary conditions:

$$f(0;L,M,Q) = 1 \text{ if } M < L;$$
$$f(x;L,M,Q) = 0 \text{ if } M < L \text{ and } x > 0 \qquad (7).$$

The following general formulas for C_{ij}, obtained by expanding and rearranging terms in Eqn. (4), can thus be used in Eqn. (6) to obtain a formula for f(x;L,M,Q):

For $L>1$, define C_{ij} $(i=1,\ldots,L;j=0,1)$ as follows:

$$\left.\begin{aligned} C_{1,0} &= (4-Q_{L-1})/4 \\ C_{1,1} &= Q_{L-1}/4 \\ C_{L,0} &= (4Q_1-1)/4^L \\ C_{L,1} &= (1-4Q_1)/4^L = -C_{L,0} \end{aligned}\right\} \qquad (8).$$

Also, if $L > 2$, then for $k=1$ to $L-2$:

$$C_{L-k,0} = (4Q_{k+1} - Q_k)/4^{L-k}$$

$$C_{L-k,1} = (Q_k - 4Q_{k+1})/4^{L-k} = -C_{L-k,0}$$

Eqn. (6) is applicable for $M=L,\ldots,\infty$ and $x=0,\ldots,M-L+1$. If $x=0$, then terms involving the argument $x-1$ are equal to zero. Table 1 provides formulas for $f(x;L,M,Q)$ for all possible Q's for $L=2$ to $L=8$.

Using the subsequence ACA as an example, so that $L=3$ and $Q=1,0,1$, the C_{ij}'s are obtained as follows:

$$C_{1,0} = 1$$
$$C_{1,1} = 0$$
$$C_{3,0} = 3/4^3$$
$$C_{3,1} = -3/4^3$$
$$C_{2,0} = -1/4^2$$
$$C_{2,1} = 1/4^2$$

Therefore, from Eqn. (6),

$$f(x;L,M,Q) = f(x;L,M-1,Q) - f(x;L,M-2,Q)/16 + 3f(x;L,M-3,Q)/64$$

$$+ f(x-1;L,M-2,Q)/16 - 3f(x-1;L,M-3,Q)/64$$

as in Table 1.

The formulas thus derived for $f(x;L,M,Q)$ are recursive; $f(x;L,M,Q)$ depends in general on $f(x;L,M-i,Q)$ and $f(x-1;L,M-i,Q)$ for $i=1,\ldots,L$. (The proof of this follows from Eqn. (3) and from the fact that no term of the prefix polynomial $h(u/4)$ can be of degree greater than $L-1$.) Thus, a computer program to calculate numeric values of $f(x;L,M,Q)$ for $x = 0$ to an upper limit J needs to store an L by J-L array of probabilities. Alternatively, a recursive programming language such as Pascal or Algol can be used. In either

case, initialization is performed using the boundary conditions of Eqn. (7). A Fortran program to compute f(x;L,M,Q), E(X), and V(X) given L, M, and the subsequence is available from the authors.

Eqn. (6) is valid for the binomial distribution (i.e., for L=1 and Q=1) if $C_{1,0} = \frac{3}{4}$ and $C_{1,1} = \frac{1}{4}$, yielding the recursion formula

$$f(x;L,M,Q) = 3f(x;L,M-1,Q)/4 + f(x-1;L,M-1,Q)/4 \qquad (9).$$

Note from Eqn. (8) that if $L > 1$, the only case in which $C_{1,0} = \frac{3}{4}$ and $C_{1,1} = \frac{1}{4}$ is when $Q_{L-1}=1$, in which case $Q_1=Q_2=\ldots=Q_{L-2}=1$, so that all remaining C_{ij}'s in Eqn. (6) are nonzero.

Table 2 shows values of f(x;4,20,Q) for the three subsequences AAAA, ACAC, and ACGT, chosen to represent subsequences having "high", "medium", and "low" degrees of overlap capability, respectively.

5. EXAMPLES OF THE USE OF THE PROBABILITY FUNCTION IN EXACT AND APPROXIMATE SIGNIFICANCE TESTS.

The availability of formulas for $f(x;L,M,Q)$ makes it possible to perform exact significance tests of the hypothesis of randomness, and the formulas for $E(X)$ and $V(X)$ provide the needed quantities for an approximate test. As an example, an 825-nucleotide-long sequence obtained from Georgetown University Medical Center's Nucleic Sequence Database and shown in Table 3 will be used. It is described in Dayhoff et al. (1983) as a "Middle repetitive (Alu family) genome fragment - human (length 825)." This intergenic material was one of 14 sequences examined in Gentleman et al. (1984).

The subsequence CC occurs 67 times in this genome fragment. Under the hypothesis, the frequency of its occurrence in a sequence of length 825 has an expected value of 51.50 and a variance of 67.57. Table 4 shows probabilities and cumulative probabilities for frequencies from 30 through 70. (The complete range is from 0 through 824.) Using these probabilities, the significance level for an exact test of the hypothesis can be calculated as the sum of the probabilities for frequencies ≥ 67, plus the sum of the probabilities for frequencies ≤ 36 (these being all frequencies with probabilities less than or equal to $Pr(67)$). Thus, the significance level = .039 + .028 = .067.

By identifying frequencies as close as possible to the .025 and .975 points of this discrete distribution, a 95% confidence interval is obtained; its lower bound is between 35 and 36, and its upper bound is between 67 and 68.

The usual approximate Chi-square goodness-of-fit test has sometimes been used to compare observed and expected subsequence frequencies. (For example, Smith et al. (1983) used this test with expected frequencies based on the overall sequence base composition.) The goodness-of-fit test sums the scaled squared differences between observed and expected frequencies. The two observed frequencies in the present example are 67 (the number of occurrences of CC) and 757 (the number of occurrences of other subsequences of length two). The resulting test statistic value is 4.976, so the approximate significance level for this test would normally be calculated as $Pr(\chi^2_1 \geq 4.976) = .0257$, which is considerably smaller than the exact value of .0670. However, the goodness-of-fit test is inappropriate here, due to differences, which remain even as $n \rightarrow \infty$, between $f(x;L,M,Q)$ and the binomial distribution (as shown in Sections 3 and 4); when there are only two observed frequencies, the goodness-of-fit test statistic is equivalent to the square of a standardized observed binomial(n,p) frequency.

An appropriate approximate test statistic can be obtained by standardizing

the observed frequency of a subsequence using the correct variance (as given in Eqn. (2)), i.e., by using $T^* = (x-np)^2/V(X)$ instead of $T = (x-np)^2/[np(1-p)]$. The central limit theorem for dependent trials can then be invoked (e.g., as in Feller (1950), p. 374, and in Shukla and Srivastava (1985)) and a χ^2_1 approximation used for sufficiently large n. In the case of the x=67 occurrences of the subsequence CC, T^*=3.5556, yielding a much more accurate approximate significance level of $Pr(\chi^2_1 \geq 3.5556) = .0594$. (Note that T^* can be used in the more general case of an a-letter alphabet with probabilities that are not necessarily equal.)

Examining a longer subsequence, the observed frequency of the subsequence CCCC is found to be 6. The expectation and variance of the exact distribution are 3.21 and 5.23, respectively. The exact significance level is .153, and the approximate significance level using T^* is .223. (The approximate significance level using T would be .119.) In this case, the approximate test is not accurate; the Chi-square approximation relies on expected frequencies being of about size five or larger, because f(x;L,M,Q) is then more symmetric.

This illustrates the fact that, for fixed n, the approximate test is less likely to be usable for a longer subsequence than for a shorter one, since E(X) decreases as L increases. Fortuitously, computation of an exact significance level is considerably faster (and therefore cheaper) for a larger value of L than for a smaller one; both lower and upper tail areas are required to calculate the P-value for a two-sided test, and when E(X) is relatively small, fewer values of f(x;L,M,Q) need to be calculated recursively before reaching the upper tail of the distribution.

The sequence TTTTTT occurs twice in Table 3. The expected number of occurrences is .20, and the variance is .33. The significance level for the exact test is .042. Since the expected frequency is so small, an approximate test would not be used. (If it were, the resulting significance level would be .00181 for T^* and .00006 for T.)

As a final example, consider the subsequences TTGTTT and AAACAA, which occur six and five times, respectively. These subsequences are inverse complements of each other; each consists of the complementary nucleotides of the other, in reverse order. Each occurs much more often than would be expected; the respective exact significance levels are $.12\times10^{-6}$ and $.31\times10^{-5}$. Perusal of the locations of occurrence of these subsequences reveals that all six occurrences of TTGTTT are close together (beginning in positions 773, 778, 785, 789, and 797), and that four of the five occurrences of AAACAA are close together (in

positions 355, 361, 375, and 387). The two clusters of subsequences occur slightly more than 400 nucleotides apart in the overall sequence. This suggests the possibility that the sequence has a looped superstructure, stabilized by the bonding together of two regions which are about 400 nucleotides apart.

6. CONCLUDING REMARKS.

Formulas have been provided here, and methods described for obtaining any others which are needed, which permit means, variances, and probabilities to be calculated for distributions of nucleotide subsequence frequencies. Exact significance tests can be performed and confidence intervals calculated, or an approximate test can be used, to analyze patterns of nonrandomness in nucleotide sequences or subsequences. This can assist scientists in learning about the structure and functionality of the (sub)sequences. The exact methods are especially useful when the expected subsequence frequency and/or the sequence length is so small that an approximate test is not usable. On the other hand, the approximate test can be used for the more general case where the letters of the genetic alphabet have hypothesized probabilities which are not necessarily equal.

Significance levels from these tests can also be used to compare two or more sequences, as follows: For a given subsequence S, perform the significance test for each sequence and compare the P-values, thus comparing the deviation of the sequences from a common null hypothesis. Comparison of P-values instead of observed frequencies permits sequences of different lengths to be compared, thus avoiding problems of alignment. It also permits results for subsequences having different lengths or overlap capabilities to be compared, since the P-value is standardized according to each subsequence's own frequency distribution.

In analyzing patterns within a sequence, it will be natural to repeat these tests for numerous subsequences, in which case the analyst should bear in mind the usual caveats appropriate for multiple comparisons. One possible approach, in the spirit of Daniel (1959), would be to use a χ_1^2 (or half-normal or normal) probability plot to analyze multiple values of the approximate test statistic T^2 (or its square root, or its signed square root, respectively).

When it is appropriate to assess the degree of departure from randomness, these concepts and methods can also be applied to the analysis of sequences of amino acids in proteins, and in fields other than molecular biology, e.g., in time series analysis and cryptography.

It would be useful if future research could produce a generalization of the frequency distribution formulas to the case of unequal probabilities for dif-

ferent alphabet letters.

7. ACKNOWLEDGEMENTS.

The authors wish to thank W.F. Forbes and M.A. Shadbolt-Forbes of the University of Waterloo, whose work motivated the problem addressed in this paper, and who provided much scientific information. We also thank the referees for some very useful suggestions, and Audrey Sirois of Statistics Canada for her careful mathematical typing.

8. REFERENCES.

Aquadro, Charles F. and Greenberg, Barry D. (1983). Human Mitochondrial DNA Variation and Evolution: Analysis of Nucleotide Sequences from Seven Individuals. Genetics, 103, 287-312.

Biggins, J.D. and Cannings, C. (1987). Markov Renewal Processes, Counters and Repeated Sequences in Markov Chains. Adv. Appl. Prob., 19, 521-545.

Daniel, C. (1959). Use of Half-Normal Plots in Interpreting Factorial Two-Level Experiments. Technometrics, 1, 311-341.

Dayhoff, M.O., Chen, H.R., Hunt, L.T., Barker, W.C., Yeh, L.-S., George, D.G., and Orcutt, B.C. (1983). Nucleic Acid Sequence Database, user's manual for June 1983 Release, National Biomedical Research Foundation, Document NASD-0683C, Georgetown Univ. Medical Center.

Doolittle, W. Ford and Sapienza, Carmen (1980). Selfish Genes, the Phenotype Paradigm and Genome Evolution. Nature, 284, 601-603.

Feller, William (1950). An Introduction to Probability Theory and Its Applications. Volume I. Second Edition. Wiley, New York.

Forbes, W.F. and Shadbolt-Forbes, M.A. (1988). The Role of Pattern Analysis of DNA. Presented at ASA Winter Conference on Statistics in Biotechnology, San Antonio.

Fuchs, Camil (1980). On the Distribution of the Nucleotides in Seven Completely Sequenced DNAs. Gene, 10, 371-373.

Garden, Peter W. (1980). Markov Analysis of Viral DNA/RNA Sequences. Journal of Theoretical Biology, 82, 679-684.

Gentleman, Jane F. and Mullin, Ronald C. (1986). The Distribution of the Frequency of Occurrence of Nucleotide Substrings, Based on Their Overlap Capability. COMPSTAT 86, Short communications and posters, Rome, Italy, 97-98.

Gentleman, Jane F. and Mullin, Ronald C. (1987). Algorithms for Calculating the Distribution of the Frequency of Occurrence of Nucleotide Substrings. Unpublished manuscript.

Gentleman, J.F., Shadbolt-Forbes, M.A., Hawkins, J.W., Ladik, J., and Forbes, W.F. (1984). Problems of Pattern Recognition in Nucleotide Sequences. Math. Scientist, 9, 125-139.

Goulden, Ian P. and Jackson, David M. (1983). Combinatorial Enumeration. Wiley Interscience, New York.

Grantham, R., Gautier, C., Gouy, M., Jacobzone, M., and Mercier, R. (1981). Codon Catalog Usage is a Genome Strategy Modulated for Gene Expressivity. Nucleic Acids Research, 9, r43-r74.

Guibus, L.J. and Odlyzko, A.M. (1981). Periods in Strings. Journal of Combinatorial Theory, Series A, 30, 19-42.

Guyton, Arthur C. (1969). Function of the Human Body, Third Edition. W.B. Saunders, Phila., London, Toronto.

Harr, Robert, Haggstrom, Mikael, and Gustafsson, Petter (1983). Search Al-

gorithm for Pattern Match Analysis of Nucleic Acid Sequences. Nucleic Acids Research, 11, 2943-2957.

Karlin, Samuel and Ost, Friedemann (1987). Counts of Long Aligned Word Matches Among Random Letter Sequences. Adv. Appl. Prob., 19, 293-351.

Korn, Laurence Jay and Queen, Cary (1984). Analysis of Biological Sequences on Small Computers. DNA, 3, 421-436.

Maizel, Jacob V., Jr. and Lenk, Robert P. (1981). Enhanced Graphic Matrix Analysis of Nucleic Acid and Protein Sequences. Proceedings of the National Academy of Science USA, 78, 7665-7669.

Nussinov, R. (1984). Doublet frequencies in evolutionary distinct groups. Nucleic Acids Research, 12, 1749-1763.

Orgel, L.E. and Crick, F.H.C. (1980). Selfish DNA: The Ultimate Parasite. Nature, 284, 604-607.

Queen, Cary L. and Korn, Laurence Jay (1980). Computer Analysis of Nucleic Acids and Proteins. Methods in Enzymology, 65, 595-609.

Sadler, J.R., Waterman, M.S., and Smith, T.F. (1983). Regulatory Pattern Identification in Nucleic Acid Sequences. Nucleic Acids Research, 11, 2221-2231.

Sege, Robert D. and Saxberg, Bo E.H. (1982). A Statistical Test for Comparing Several Nucleotide Sequences. Nucleic Acids Research, 10, 375-389.

Shukla, Rakesh and Srivastava, R.C. (1985). The Statistical Analysis of Direct Repeats in Nucleic Acid Sequences. J. Appl. Prob., 22, 15-24.

Smith, Temple F. and Burks, Christian (1983). Searching for Sequence Similarities. Nature, 301, 194.

Smith, T.F., Waterman, M.S., and Sadler, J.R. (1983). Statistical Characterization of Nucleic Acid Sequence Functional Domains. Nucleic Acids Research, 11, 2205-2220.

Vass, J. Keith and Wilson, Richard H. (1984). 'ZSTATS' - A Statistical Analysis for Potential Z-DNA Sequences. Nucleic Acids Research, 12, 825-832.

Weir, B.S. (1985). Statistical Analysis of Molecular Genetic Data. IMA J. Mathematics Applied in Medicine & Biology, 2, 1-39.

TABLE 1: Formulas for f(x;L,M,Q)
for All Possible Q's for L=2 to L=8

For notational brevity, f(x;L,M,Q) is denoted a(M,x).
Formulas are applicable for M=L, and x=0,M-L+1.
If x=0, terms involving the argument x-1 are equal to zero.

L=2:

Q=0,1 (e.g., S=AC)

$$a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-2,x)/16 + a(M-2,x-1)/16$$

Q=1,1 (e.g., S=AA)

$$a(M,x) = 3a(M-1,x)/4 + 3a(M-2,x)/16 + a(M-1,x-1)/4 - 3a(M-2,x-1)/16$$

L=3:

Q=0,0,1 (e.g., S=ACC)

$$a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-3,x)/64 + a(M-3,x-1)/64$$

Q=1,0,1 (e.g., S=ACA)

$$a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-2,x)/16 + 3a(M-3,x)/64 + a(M-2,x-1)/16 - 3a(M-3,x-1)/64$$

Q=1,1,1 (e.g., S=AAA)

$$a(M,x) = 3a(M-1,x)/4 + 3a(M-2,x)/16 + 3a(M-3,x)/64 + a(M-1,x-1)/4 - 3a(M-2,x-1)/16 - 3a(M-3,x-1)/64$$

L=4:

Q=0,0,0,1 (e.g., S=ACGT)

$$a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-4,x)/256 + a(M-4,x-1)/256$$

Q=0,1,0,1 (e.g., S=ACAC)

$$a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-2,x)/16 + a(M-3,x)/16 - a(M-4,x)/256 + a(M-2,x-1)/16 - a(M-3,x-1)/16 + a(M-4,x-1)/256$$

Q=1,0,0,1 (e.g., S=ACGA)

$$a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-3,x)/64 + 3a(M-4,x)/256 + a(M-3,x-1)/64 - 3a(M-4,x-1)/256$$

Q=1,1,1,1 (e.g., S=AAAA)

$$a(M,x) = 3a(M-1,x)/4 + 3a(M-2,x)/16 + 3a(M-3,x)/64 + 3a(M-4,x)/256 + a(M-1,x-1)/4 - 3a(M-2,x-1)/16 - 3a(M-3,x-1)/64 - 3a(M-4,x-1)/256$$

L=5:

Q=0,0,0,0,1 (e.g., S=ACGTT)

$$a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-5,x)/1024 + a(M-5,x-1)/1024$$

Q=0,1,0,0,1 (e.g., S=ACGAC)

$$a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-3,x)/64 + a(M-4,x)/64 - a(M-5,x)/1024 + a(M-3,x-1)/64 - a(M-4,x-1)/64 + a(M-5,x-1)/1024$$

Q=1,0,0,0,1 (e.g., S=ACGTA)

$$a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-4,x)/256 + 3a(M-5,x)/1024 + a(M-4,x-1)/256 - 3a(M-5,x-1)/1024$$

```
Q=1,0,1,0,1 (e.g., S=ACACA)
  a(M,x) = a(M-1,x)
         - a(M-2,x)/16 + a(M-3,x)/16
         - a(M-4,x)/256
         + 3a(M-5,x)/1024
         + a(M-2,x-1)/16 - a(M-3,x-1)/16
         + a(M-4,x-1)/256 - 3a(M-5,x-1)/1024

Q=1,1,0,0,1 (e.g., S=AACAA)
  a(M,x) = a(M-1,x)
         - a(M-3,x)/64
         + 3a(M-4,x)/256 + 3a(M-5,x)/1024
         + a(M-3,x-1)/64
         - 3a(M-4,x-1)/256 - 3a(M-5,x-1)/1024

Q=1,1,1,1,1 (e.g., S=AAAAA)
  a(M,x) = 3a(M-1,x)/4
         + 3a(M-2,x)/16
         + 3a(M-3,x)/64
         + 3a(M-4,x)/256 + 3a(M-5,x)/1024
         + a(M-1,x-1)/4
         - 3a(M-2,x-1)/16
         - 3a(M-3,x-1)/64
         - 3a(M-4,x-1)/256 - 3a(M-5,x-1)/1024

L=6:

Q=0,0,0,0,0,1 (e.g., S=ACGTAG)
  a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-6,x)/4096
         + a(M-6,x-1)/4096

Q=0,0,1,0,0,1 (e.g., S=ACGACG)
  a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-3,x)/64 + a(M-4,x)/64
         - a(M-6,x)/4096
         + a(M-3,x-1)/64 - a(M-4,x-1)/64
         + a(M-6,x-1)/4096

Q=0,1,0,0,0,1 (e.g., S=ACCCAC)
  a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-4,x)/256 + a(M-5,x)/256
         - a(M-6,x)/4096
         + a(M-4,x-1)/256 - a(M-5,x-1)/256
         + a(M-6,x-1)/4096

Q=0,1,0,1,0,1 (e.g., S=ACACAC)
  a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-2,x)/16 + a(M-3,x)/16
         - a(M-4,x)/256 + a(M-5,x)/256
         - a(M-6,x)/4096
         + a(M-2,x-1)/16 - a(M-3,x-1)/16
         + a(M-4,x-1)/256 - a(M-5,x-1)/256
         + a(M-6,x-1)/4096

Q=1,0,0,0,0,1 (e.g., S=ACGTCA)
  a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-5,x)/1024 + 3a(M-6,x)/4096
         + a(M-5,x-1)/1024 - 3a(M-6,x-1)/4096

Q=1,0,1,0,0,1 (e.g., S=ACAACA)
  a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-3,x)/64 + a(M-4,x)/64
         - a(M-5,x)/1024 + 3a(M-6,x)/4096
         + a(M-3,x-1)/64 - a(M-4,x-1)/64
         + a(M-5,x-1)/1024 - 3a(M-6,x-1)/4096

Q=1,1,0,0,0,1 (e.g., S=AAGTAA)
  a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-4,x)/256 + 3a(M-5,x)/1024
         + 3a(M-6,x)/4096
         + a(M-4,x-1)/256 - 3a(M-5,x-1)/1024
         - 3a(M-6,x-1)/4096

Q=1,1,1,1,1,1 (e.g., S=AAAAAA)
  a(M,x) = 3a(M-1,x)/4
         + 3a(M-2,x)/16
         + 3a(M-3,x)/64
         + 3a(M-4,x)/256
         + 3a(M-5,x)/1024 + 3a(M-6,x)/4096
         + a(M-1,x-1)/4
         - 3a(M-2,x-1)/16
         - 3a(M-3,x-1)/64
         - 3a(M-4,x-1)/256
         - 3a(M-5,x-1)/1024 - 3a(M-6,x-1)/4096
```

L=7:

Q=0,0,0,0,0,0,1 (e.g., S=ACGTACA)

$$a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-7,x)/16384 + a(M-7,x-1)/16384$$

Q=0,0,1,0,0,0,1 (e.g., S=ACGTACG)

$$a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-4,x)/256 + a(M-5,x)/256 - a(M-7,x)/16384 + a(M-4,x-1)/256 - a(M-5,x-1)/256 + a(M-7,x-1)/16384$$

Q=0,1,0,0,0,0,1 (e.g., S=ACGTTAC)

$$a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-5,x)/1024 + a(M-6,x)/1024 - a(M-7,x)/16384 + a(M-5,x-1)/1024 - a(M-6,x-1)/1024 + a(M-7,x-1)/16384$$

Q=1,0,0,0,0,0,1 (e.g., S=ACGTACA)

$$a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-6,x)/4096 + 3a(M-7,x)/16384 + a(M-6,x-1)/4096 - 3a(M-7,x-1)/16384$$

Q=1,0,0,1,0,0,1 (e.g., S=ACGACGA)

$$a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-3,x)/64 + a(M-4,x)/64 - a(M-6,x)/4096 + 3a(M-7,x)/16384 + a(M-3,x-1)/64 - a(M-4,x-1)/64 + a(M-6,x-1)/4096 - 3a(M-7,x-1)/16384$$

Q=1,0,1,0,0,0,1 (e.g., S=ACAAACA)

$$a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-4,x)/256 + a(M-5,x)/256 - a(M-6,x)/4096 + 3a(M-7,x)/16384 + a(M-4,x-1)/256 - a(M-5,x-1)/256 + a(M-6,x-1)/4096 - 3a(M-7,x-1)/16384$$

Q=1,0,1,0,1,0,1 (e.g., S=ACACACA)

$$a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-2,x)/16 + a(M-3,x)/16 - a(M-4,x)/256 + a(M-5,x)/256 - a(M-6,x)/4096 + 3a(M-7,x)/16384 + a(M-2,x-1)/16 - a(M-3,x-1)/16 + a(M-4,x-1)/256 - a(M-5,x-1)/256 + a(M-6,x-1)/4096 - 3a(M-7,x-1)/16384$$

Q=1,1,0,0,0,0,1 (e.g., S=AACCCAA)

$$a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-5,x)/1024 + 3a(M-6,x)/4096 + 3a(M-7,x)/16384 + a(M-5,x-1)/1024 - 3a(M-6,x-1)/4096 - 3a(M-7,x-1)/16384$$

Q=1,1,1,0,0,0,1 (e.g., S=AAACAAA)

$$a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-4,x)/256 + 3a(M-5,x)/1024 + 3a(M-6,x)/4096 + 3a(M-7,x)/16384 + a(M-4,x-1)/256 - 3a(M-5,x-1)/1024 - 3a(M-6,x-1)/4096 - 3a(M-7,x-1)/16384$$

```
Q=1,1,1,1,1,1,1,1 (e.g., S=AAAAAAA)
  a(M,x) = 3a(M-1,x)/4
         + 3a(M-2,x)/16
         + 3a(M-3,x)/64
         + 3a(M-4,x)/256
         + 3a(M-5,x)/1024 + 3a(M-6,x)/4096
         + 3a(M-7,x)/16384
         + a(M-1,x-1)/4
         - 3a(M-2,x-1)/16
         - 3a(M-3,x-1)/64
         - 3a(M-4,x-1)/256
         - 3a(M-5,x-1)/1024 - 3a(M-6,x-1)/4096
         - 3a(M-7,x-1)/16384

L=8:

Q=0,0,0,0,0,0,0,1 (e.g., S=ACGTGGTC)
  a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-8,x)/65536
         + a(M-8,x-1)/65536

Q=0,0,0,1,0,0,0,1 (e.g., S=ACGTACGT)
  a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-4,x)/256 + a(M-5,x)/256
         - a(M-8,x)/65536
         + a(M-4,x-1)/256 - a(M-5,x-1)/256
         + a(M-8,x-1)/65536

Q=0,0,1,0,0,0,0,1 (e.g., S=ACGTTACG)
  a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-5,x)/1024 + a(M-6,x)/1024
         - a(M-8,x)/65536
         + a(M-5,x-1)/1024 - a(M-6,x-1)/1024 + a(M-8,x-1)/65536

Q=0,1,0,0,0,0,0,1 (e.g., S=ACGTGTAC)
  a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-6,x)/4096 + a(M-7,x)/4096
         - a(M-8,x)/65536
         + a(M-6,x-1)/4096 - a(M-7,x-1)/4096 + a(M-8,x-1)/65536

Q=0,1,0,0,1,0,0,1 (e.g., S=ACGACGAC)
  a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-3,x)/64 + a(M-4,x)/64
         - a(M-6,x)/4096 + a(M-7,x)/4096
         - a(M-8,x)/65536
         + a(M-3,x-1)/64 - a(M-4,x-1)/64
         + a(M-6,x-1)/4096 - a(M-7,x-1)/4096
         + a(M-8,x-1)/65536

Q=0,1,0,1,0,1,0,1 (e.g., S=ACACACAC)
  a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-2,x)/16 + a(M-3,x)/16
         - a(M-4,x)/256 + a(M-5,x)/256 - a(M-6,x)/4096
         + a(M-7,x)/4096
         - a(M-8,x)/65536
         + a(M-2,x-1)/16 - a(M-3,x-1)/16
         + a(M-4,x-1)/256 - a(M-5,x-1)/256 + a(M-6,x-1)/4096
         - a(M-7,x-1)/4096
         + a(M-8,x-1)/65536

Q=1,0,0,0,0,0,0,1 (e.g., S=ACCCCCCA)
  a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-7,x)/16384 + 3a(M-8,x)/65536
         + a(M-7,x-1)/16384 - 3a(M-8,x-1)/65536

Q=1,0,0,1,0,0,0,1 (e.g., S=ACGAACGA)
  a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-4,x)/256 + a(M-5,x)/256
         - a(M-7,x)/16384 + 3a(M-8,x)/65536
         + a(M-4,x-1)/256 - a(M-5,x-1)/256
         + a(M-7,x-1)/16384
         - 3a(M-8,x-1)/65536

Q=1,0,1,0,0,0,0,1 (e.g., S=ACAGGACA)
  a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-5,x)/1024 + a(M-6,x)/1024
         - a(M-7,x)/16384 + 3a(M-8,x)/65536
         + a(M-5,x-1)/1024 - a(M-6,x-1)/1024
         + a(M-7,x-1)/16384 - 3a(M-8,x-1)/65536

Q=1,1,0,0,0,0,0,1 (e.g., S=AACCCCAA)
  a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-6,x)/4096 + 3a(M-7,x)/16384
         + 3a(M-8,x)/65536
         + a(M-6,x-1)/4096 - 3a(M-7,x-1)/16384
         - 3a(M-8,x-1)/65536
```

Q=1,1,0,0,1,0,0,1 (e.g., S=AAGAAGAA)

$$a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-3,x)/64 + a(M-4,x)/64 - a(M-6,x)/4096 + 3a(M-7,x)/16384 + 3a(M-8,x)/65536 + a(M-3,x-1)/64 - a(M-4,x-1)/64 + a(M-6,x-1)/4096 - 3a(M-7,x-1)/16384 - 3a(M-8,x-1)/65536$$

Q=1,1,1,0,0,0,0,1 (e.g., S=AAACGAAA)

$$a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-5,x)/1024 + 3a(M-6,x)/4096 + 3a(M-7,x)/16384 + 3a(M-8,x)/65536 + a(M-5,x-1)/1024 - 3a(M-6,x-1)/4096 - 3a(M-7,x-1)/16384 - 3a(M-8,x-1)/65536$$

Q=1,1,1,1,1,1,1,1 (e.g., S=AAAAAAAA)

$$a(M,x) = 3a(M-1,x)/4 + 3a(M-2,x)/16 + 3a(M-3,x)/64 + 3a(M-4,x)/256 + 3a(M-5,x)/1024 + 3a(M-6,x)/4096 + 3a(M-7,x)/16384 + 3a(M-8,x)/65536 + a(M-1,x-1)/4 - 3a(M-2,x-1)/16 - 3a(M-3,x-1)/64 - 3a(M-4,x-1)/256 - 3a(M-5,x-1)/1024 - 3a(M-6,x-1)/4096 - 3a(M-7,x-1)/16384 - 3a(M-8,x-1)/65536$$

TABLE 2: Values of f(x;4,20,Q), E(X), and V(X) for Q = 1,1,1,1; 0,1,0,1; and 0,0,0,1 (e.g., for Subsequences AAAA, ACAC, and ACGT)

	PROBABILITY		
FREQUENCY	AAAA	ACAC	ACGT
0	0.9499E 00	0.9383E 00	0.9350E 00
1	0.3772E-01	0.5723E-01	0.6366E-01
2	0.9351E-02	0.4156E-02	0.1359E-02
3	0.2288E-02	0.2653E-03	0.9770E-05
4	0.5527E-03	0.1509E-04	0.1629E-07
5	0.1318E-03	0.7665E-06	0.9095E-12
6	0.3099E-04	0.3442E-07	0.
7	0.7190E-05	0.1334E-08	0.
8	0.1643E-05	0.4184E-10	0.
9	0.3698E-06	0.9095E-12	0.
10	0.8175E-07	0.	0.
11	0.1773E-07	0.	0.
12	0.3757E-08	0.	0.
13	0.7749E-09	0.	0.
14	0.1528E-09	0.	0.
15	0.3001E-10	0.	0.
16	0.5457E-11	0.	0.
17	0.9095E-12	0.	0.
E(X)	.06641	.06641	.06641
V(X)	.10506	.07210	.06477

TABLE 3: Example of a Nucleotide Sequence: Middle repetitive (Alu family) genome fragment - human. Length 825. From Georgetown University Medical Center's Nucleic Acid Sequence Database.

POSITION	NUCLEOTIDES
1- 50	CTCGAGGGAGGAGCCCGGGGCTGGGGTACGGAGGCCTCTGCACATCTTAG
51-100	AGTAAAACAAGCAGGAGAGGCTGGGTGCGGTGGCTCATGCCTATAATCCC
101-150	AGCACTTTAGGAGGCTGAGGCGGGCAGATCACCTGAGGTCGGGAGTTCAA
151-200	GACCAGCCTGACCAACAGGGAGAAACCCCATCTTTACTAAAACTACAAAA
201-250	TTAGCTGGGTGTGGTGGCACATGCCTGTAATCCCAGATATTCGGGAGGCT
251-300	GAGGCAGGAGAATCGCTTGAACCTGGGAAGCAGAGGTTGCGCTGAGCCGA
301-350	GATGGCACCATTGCACTCCAGCCTGGGCAACGAGAGCGAAACTCCGTCTC
351-400	AAAAAAACAAAAACAAAAAAATCAAAACAATCAAAAAAACAAGCAGGAGG
401-450	GGCTCTGAGGTGCCTGCAACACCCAGGTACAATCCGTGGCCCTGAGGCCC
451-500	ATCACAGGGAAGGGGTCTTTGCAGCTCTTTCAACCCCCAGCCCAGCATCC
501-550	AAGGAAGCCCAGGGCAGGGAGAAACCTCAGCTGCACCATCAGAGCTCAGA
551-600	ACAGAGAAGGCAGAAATTAGCAGGGAGTGGGGCTGGGGAGGCTTCCTAGA
601-650	AGACGTGTCTCCCGCCTTGCTGGCACTGAGGCCTTGAGGATGGGTCCATA
651-700	CTGGGCCCCCACTGCCAGGGATGCAGATCCGGCCCACTGCTGAAATCTGT
701-750	GCTCCTGGAGCCTCCCTCCTGTTCATGGGCCACAGGCTGTGAAAACCCCA
751-800	GAGTCCTCCCAGGCAGCAAGTTTTGTTTTGTTTTTTGTTTGTTTGCTTGT
801-825	TTGTTTTTTTGAGAGTCTGCTCGTCA

TABLE 4: Values of f(x;2,825,Q), E(X), and V(X) for Q = 1,1 and x=30,70 (e.g., for Subsequence CC)

FREQUENCY	PROBABILITY	CUMULATIVE PROBABILITY
30	0.0010	0.0028
31	0.0016	0.0044
32	0.0023	0.0066
33	0.0032	0.0098
34	0.0044	0.0142
35	0.0059	0.0202
36	0.0078	0.0280
37	0.0101	0.0381
38	0.0128	0.0509
39	0.0158	0.0667
40	0.0191	0.0858
41	0.0227	0.1085
42	0.0265	0.1350
43	0.0303	0.1654
44	0.0341	0.1995
45	0.0377	0.2372
46	0.0409	0.2781
47	0.0437	0.3219
48	0.0460	0.3678
49	0.0476	0.4154
50	0.0484	0.4638
51	0.0486	0.5124
52	0.0481	0.5605
53	0.0468	0.6074
54	0.0450	0.6524
55	0.0427	0.6950
56	0.0399	0.7349
57	0.0368	0.7717
58	0.0335	0.8053
59	0.0302	0.8354
60	0.0268	0.8622
61	0.0235	0.8857
62	0.0204	0.9061
63	0.0175	0.9235
64	0.0148	0.9383
65	0.0124	0.9507
66	0.0103	0.9610
67	0.0084	0.9694
68	0.0068	0.9762
69	0.0055	0.9816
70	0.0043	0.9860

E(X)	51.50
V(X)	67.57

APPENDIX

Derivation of the Probability Generating Function P(u,v)

Let $P(u,v) = \sum_{M=0}^{\infty} \sum_{x=0}^{\infty} a_{M,x} u^M v^x$, where $a_{M,x}$ is the probability of x occurrences of a specified string S of length L and overlap capability Q in a string of length M. The approach is to develop a generating function which counts the x occurrences of S as a substring, and to convert the result to a probability generating function. The derivation here is an application of the material in Goulden and Jackson (1983, Section 2.8), restricted to the special case of one distinguished substring, and developed for an alphabet N of n symbols.

Let S be a non null string of length L. A cluster of length M and index t is a string C with a distinguished subset of members $s_{k_1}, s_{k_2}, \ldots, s_{k_t}$ and a distinguished set of substrings $T_1, T_2, \ldots T_t$ with the following properties:

(1) Each T_i is the string S;

(2) The symbol s_{k_i} is the first member of T_i;

(3) The subscript k_1 is 1, and $k_t = M-L+1$, that is, the first and last L symbols of C are distinguished substrings;

(4) Any consecutive pair of substrings overlap;

(5) Every element of C occurs in at least one T_i.

Note that not every substring of C which is identical with S need be distinguished. For example, let S = ACACAC. Then a cluster of length 12 and index 3 is ACACACACACAC, where the distinguished substrings begin in the first, third, and seventh position. There is a string identical to S which begins in the fifth position, but this is neither distinguished nor counted in the index count.

To introduce the overlap information, the prefix polynomial is used. A prefix of a string S is a non-null string P such that there exist non-null strings X and Y such that S = PX = YP. Let $\{n_1, n_2, \ldots n_u\}$ denote the set of prefix lengths in S. Then the prefix polynomial is $h(x) = \sum_{i=1}^{u} x^{n_i}$. Note that this definition coincides with that given in Section 4.

Note that any cluster C of index t can be uniquely decomposed into an ordered set of t-1 prefixes and a copy of S, with each prefix beginning with a distinguished element and terminating just before the following such element. For the cluster given above, the decomposition is AC,ACAC,ACACAC. Conversely, such an ordered collection gives rise to a unique cluster of index t by reversing the above procedure.

Let $c_{M,t}$ denote the number of clusters of length M and index t relative to the string S. The cluster generating function C(u,v) for S is defined by

$$C(u,v) = \sum_{M=0}^{\infty} \sum_{t=0}^{\infty} c_{M,t}\, u^M v^t.$$

In the following, we use the fact that the generating function for an ordered collection of objects is given by the product of the generating functions for the objects; that is, if A and B are collections of objects with generating functions $\underline{A}$ and $\underline{B}$ respectively, then the collection of objects (a,b) where $a \in A$ and $b \in B$ is $\underline{A}\,\underline{B}$. For further details see Goulden and Jackson (1983).

Lemma. Let S be a string of length L with prefix polynomial h(x). Then the cluster generating function for S is

$$C(u,v) = u^L v/(1-vh(u)).$$

Proof. As noted above, a cluster of index t can be decomposed into an ordered collection of t-1 prefixes and a copy of S. The generating function for $\{S\}$ is $u^L v$, and for the prefixes is vh(u), so the generating function for clusters of weight t is

$$(vh(u))^{t-1}\, u^L v.$$

Summing over all values of t yields

$$C(u,v) = u^L v \sum_{t=1}^{\infty} (vh(u))^{t-1}$$

$$= u^L v/(1-vh(u))$$

as required.

To obtain the generating function for the number of occurrences of S as a substring of all strings of length M from N, it is convenient to work with indexed strings. An indexed string T of length M and index t (relative to a string of length L) is a string of length M with a distinguished subset of entries $s_{k_1}, s_{k_2}, \ldots, s_{k_t}$ and a distinguished set of substrings $T_1, T_2, \ldots, T_t$ with the following properties:

(1) Each T_i is the string S;

(2) s_{k_i} is the first entry of T_i.

Note that unlike clusters, we do not require that the first or last strings of length L be copies of S, nor must every element occur in a distinguished string. Also, adjacent distinguished subsets need not overlap.

Let $d_{M,t}$ denote the number of indexed strings of length M and index t relative to S. Then the index string generating function for S is

$$D(u,v) = \sum_{M=0}^{\infty} \sum_{t=0}^{\infty} d_{M,t}\, u^M v^t.$$

Lemma. Let S be a string of length L with cluster generating function C(u,v). Then the indexed string generating function for S is

$$D(u,v) = (1-nu-C(u,v))^{-1}$$

where n is the number of alphabet symbols.

As with clusters, indexed sets can be uniquely decomposed into ordered collections; this time the entries will either be a single element from N or a cluster. To obtain the decomposition, work from the beginning to the end,

examining each character and treating it as a single entry in the ordered collection until a distinguished element s_{k_i} is hit. This will be a beginning of a unique cluster, which is then used as an entry in the collection. The scan continues until the end is reached. Conversely, any ordered collection of single elements and clusters gives rise to a unique corresponding indexed sequence. Since there are n alphabet symbols, the generating function for the set of entries for each position in the collection is $nu+C(u,v)$, and the generating function for all collections of length w is $(nu+C(u,v))^w$. Adding over all w yields the result.

Note that the introduction of symbols between clusters in the creation of indexed sets can introduce extra copies of S (which are not distinguished in the cluster). Also, there may be undistinguished copies of S within the clusters themselves. Let T be a string of length M from N which contains precisely k substrings identical to S. By considering the construction of indexed strings, we see that T is counted in D(x,y) precisely once for each subset of the k copies of S. That is, D(x,y) is an "at least" generating function for the set of strings counted by the number of copies of S which it contains, in the sense of the principle of inclusion and exclusion (see, for example, Goulden and Jackson (1983)).

In generating function form, the principle of inclusion and exclusion states that if f(z) is the generating function for the number of objects which contain "at least" k properties (in the above sense), then the generating function g(z) for the number of objects with exactly k properties is given by $g(z) = f(z-1)$. Therefore if $f_{M,x}$ denotes the number of strings of length M from N which contain precisely x substrings identical to S, and

$$F(u,v) = \sum_{M=0}^{\infty} \sum_{x=0}^{\infty} f_{M,x}\, u^M v^x,$$

then

$$F(u,v) = (1-nu-C(u,v-1))^{-1}.$$

There are n^M possible sequences of length M, so to obtain the probability generating function P(u,v), replace u by u/n in F(u,v). In particular, if n = 4, then

$$P(u,v) = \frac{1-(v-1)h(u/4)}{[1-(v-1)h(u/4)](1-u)-(u/4)^L(v-1)}$$

as in Section 4.

ANALYTICAL STUDIES BRANCH

RESEARCH PAPER SERIES

No.

1. BEHAVIOURAL RESPONSE IN THE CONTEXT OF SOCIO-ECONOMIC MICROANALYTIC SIMULATION by Lars Osberg

2. UNEMPLOYMENT AND TRAINING by Garnett Picot

3. HOMEMAKER PENSIONS AND LIFETIME REDISTRIBUTION by Michael Wolfson

4. MODELLING THE LIFETIME EMPLOYMENT PATTERNS OF CANADIANS by Garnett Picot

5. JOB LOSS AND LABOUR MARKET ADJUSTMENT IN THE CANADIAN ECONOMY by Garnett Picot and Ted Wannell

6. A SYSTEM OF HEALTH STATISTICS: TOWARD A NEW CONCEPTUAL FRAMEWORK FOR INTEGRATING HEALTH DATA by Michael Wolfson

7. A PROTOTYPE MICRO-MACRO LINK FOR THE CANADIAN HOUSEHOLD SECTOR SESSION 3, MACRO/MICRO LINKAGES - HOUSEHOLDS by Hans Adler and Michael Wolfson

8. NOTES ON CORPORATE CONCENTRATION AND CANADA'S INCOME TAX by Michael Wolfson

9. THE EXPANDING MIDDLE: SOME CANADIAN EVIDENCE ON THE DESKILLING DEBATE by John Myles

10. THE RISE OF THE CONGLOMERATE ECONOMY by Jorge Niosi

11. ENERGY ANALYSIS OF CANADIAN EXTERNAL TRADE: 1971 and 1976 by K.E. Hamilton

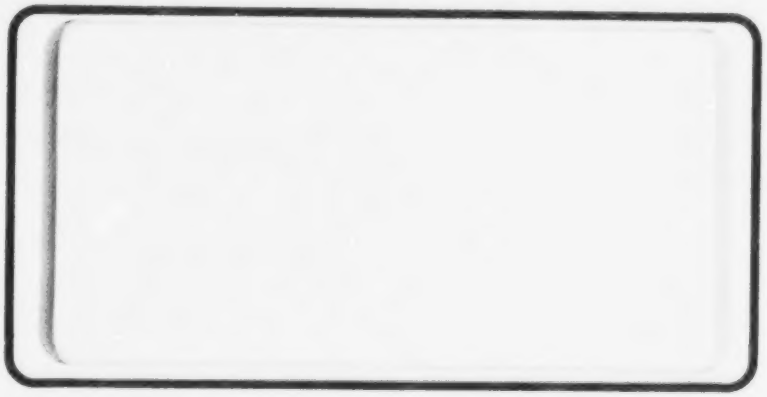
12. NET AND GROSS RATES OF LAND CONCENTRATION by Ray Bollman Philip Ehrensaft

13. CAUSE-DELETED LIFE TABLES FOR CANADA (1921 to 1981): An Approach Towards Analysing Epidemiologic Transition by Drhuva Nagnur and Michael Nagrodski

14. THE DISTRIBUTION OF THE FREQUENCY OF OCCURRENCE OF NUCLEOTIDE SUBSEQUENCES BASED ON THEIR OVERLAP CAPABILITY by Jane F. Gentleman and Ronald C. Mullin

For furthur information, contact the Chairperson, Publication Review Committee, Analytical Studies Branch, R.H. Coats Bldg., 24th Floor, Statistics Canada, Tunney's Pasture, Ottawa, Ontario K1A 0T6.

Statistique Canada Statistics Canada



Statistique Canada

Direction des études analytiques

Documents de recherche

Canada

DISTRIBUTION DE LA FRÉQUENCE D'OCCURENCE DES SOUS-SÉQUENCES DE NUCLÉOTIDES, D'APRÈS LEUR CAPACITÉ DE CHEVAUCHEMENT

par

Jane F. Gentleman et Ronald C. Mullin

n° 14

Division des études sociales et économiques
Statistique Canada
1988

Les auteurs assument seuls la responsabilité des opinions formulées dans le présent document qui ne représentent pas nécessairement le point de vue de Statistique Canada.

DISTRIBUTION DE LA FRÉQUENCE D'OCCURENCE DES SOUS-SÉQUENCES DE NUCLÉOTIDES, D'APRÈS LEUR CAPACITÉ DE CHEVAUCHEMENT

par

Jane F. Gentleman et Ronald C. Mullin

n° 14

Division des études sociales et économiques
Statistique Canada
1988

Les auteurs assument seuls la responsabilité des opinions formulées dans le présent document qui ne représentent pas nécessairement le point de vue de Statistique Canada.

Distribution de la fréquence d'occurrence de sous-séquences de nucléotides, d'après leur capacité de chevauchement

Jane F. Gentleman
Statistique Canada, Division des études socio-économiques
Ottawa, Ontario, Canada K1A 0T6

Ronald C. Mullin
Université de Waterloo, Dép. de combinatoire et d'optimisation
Waterloo, Ontario, Canada N2L 3G1

RÉSUMÉ

Le code génétique de l'ADN peut être représenté sous forme d'une séquence alphabétique formée des lettres A, C, G, et T, qui représentent les quatre types de nucléotides qui composent l'ADN : acides adénylique, cytidilique, guanylique et thymidylique. Maintenant que ces séquences ont été identifiées pour de nombreux gènes et qu'on les possède sous une forme qui se prête au traitement par ordinateur, les scientifiques peuvent les analyser et y rechercher des structures, afin de tenter de mieux connaître les fonctions régulatrices du gène. L'un des sujets étudiés est la fréquence d'occurrence de sous-séquences particulières de nucléotides (par ex. ACAC) dans l'ensemble, ou une partie, d'une séquence de nucléotides. Dans le présent document, on établit la distribution de probabilité de la fréquence d'occurrence d'une sous-séquence dans une séquence de nucléotides, dans l'hypothèse où les quatre nucléotides apparaissent au hasard et avec une probabilité égale. La distribution n'est pas triviale puisque des sous-séquences différentes présentent des "capacités de chevauchement" différentes. Par exemple, la sous-séquence AAAA peut exister jusqu'à 17 fois dans une séquence de longueur 20 (ce qui se produira si la séquence est composée seulement de A), mais la sous-séquence ACGT ne peut survenir plus de 5 fois dans une séquence de longueur 20. Ainsi, les distributions de fréquences sont différentes pour chaque type de capacité de chevauchement. Il est intéressant d'évaluer et de comparer le degré d'occurrence aléatoire pour différentes sous-séquences, ou différentes parties d'une sous-séquence; l'existence et le degré d'une

---

Mots clés : sous-séquences de l'ADN; sous-séquences de nucléotides; capacité de chevauchement.

occurrence non aléatoire peuvent être reliés au type et au degré de fonctionnalité d'une (sous-)séquence de nucléotides. Au moyen des distributions de fréquences présentées ici, on peut effectuer des tests de signification exacts de l'hypothèse d'une occurrence aléatoire. On décrit aussi un test approximatif qui convient aux longues séquences; ce test peut servir à vérifier l'hypothèse nulle plus générale selon laquelle les nucléotides se présentent avec des probabilités inégales.

1. INTRODUCTION

Les gènes sont formés de longes molécules hélicoïdales, à double chaîne, d'ADN. Chacune des deux chaînes contient une séquence de nucléotides - en général de 1 500 à 15 000 - et les deux chaînes sont maintenues ensemble par des liens hydrogène faibles. On identifie un nucléotide dans l'ADN en fonction de la base azotée qu'il contient, parmi quatre possibles : deux bases puriques, l'adénine (A) et la guanine (G), et deux bases pyrimidiques, la cytosine (C) et la thymine (T). Il y a une complémentarité entre les nucléotides des deux chaînes opposées; une base A, G, C ou T est rattachée par un lien faible à son complément T, C, G ou A, respectivement, sur l'autre chaîne. Le "code génétique" de l'ADN, par conséquent, peut être représenté comme une séquence alphabétique simple composée de ces quatre lettres. C'est grâce à ce code que le gène contrôle la formation d'autres substances dans la cellule (voir, par ex., Guyton (1969)). En outre, certaines séquences de nucléotides forment des gènes oncogéniques qui peuvent être à la source de certaines formes de cancer.

Des progrès relativement récents de la biochimie ont rendue possible la détermination de séquences de nucléotides pour des nombres élevés de gènes, et pour la matériel intergénique qui, lui aussi, est formé de séquences de nucléotides. Ces données sont maintenant disponibles sous une forme qui se prête au traitement informatique, de sorte qu'on peut examiner et analyser les structures qui existent à l'intérieur des séquences en se servant de techniques statistiques et de logiciels statistiques. Les scientifiques ont maintenant la possibilité de recourir à des algorithmes de reconnaissance de structures pour "en apprendre davantage sur la nature régulatrice des divers domaines fonctionnels génétiques, et sur les éléments qui sont reconnus dans ces domaines par le matériel cellulaire..." (Sadler, Waterman et Smith (1983)).

Weir (1985) fait un relevé utile des nouveaux problèmes d'analyse statistique qui ont surgi par suite des progrès de la génétique moléculaire.

L'un des sujets d'étude porte sur la fréquence d'occurrence de courtes sous-séquences particulières (par ex. ACAC) dans l'ensemble ou une partie d'une séquence de nucléotides. Maizel et coll. (1981) ont conclu que, parmi les programmes informatiques largement utilisés pour l'analyse des acides nucléiques, "on emploie le plus souvent des programmes capables de repérer les occurrences de courtes sous-séquences qui sont utilisées par les enzymes comme signaux pour reconnaître, modifier et exprimer les acides nucléiques, qui déterminent la fréquence et les emplacements de courtes chaînes de nucléotides et qui traduisent les séquences d'acides nucléiques en séquences d'acides aminés ou en chaînes de polynucléotides complémentaires." Voici quelques exemples d'articles qui traitent de l'analyse des fréquences de sous-séquences : Aquadro et Greenberg (1983), Gentleman et coll. (1984), Grantham et coll. (1981), Harr, Haggstrom et Gustafsson (1983), Korn et Queen (1984), Nussinov (1984), Sadler et coll. (1983), Smith et Burks (1983), Smith, Waterman et Sadler (1983), Queen et Korn (1980), et Vass et Wilson (1984).

Il est intéressant d'évaluer et de comparer le degré d'occurrence non aléatoire pour différentes sous-séquences ou dans différentes parties d'une séquence; l'existence et l'ampleur d'une occurrence non aléatoire peuvent être mises en relation avec le type et le degré de fonctionnalité d'une (sous-)séquence de nucléotides. Orgel et Crick (1980) ont classé l'ADN d'organismes supérieurs en deux catégories, l'une spécifique et l'autre comparativement non spécifique. Au sujet de cette dernière, ils notent que "bon nombre d'indications laissent croire, sans le prouver, qu'une grande partie de l'ADN des organismes supérieurs ne sert guère à grand chose". Vass et Wilson (1984) décrivent des tests statistiques permettant la détection d'arrangements non aléatoires sur une chaîne de nucléotides. Ces tests "peuvent être utiles, notamment, à l'analyse d'arrangements qui, dans les séquences d'ADN, peuvent refléter en partie la structure et la fonction des gènes dont ces séquences font partie." Shukla et Srivastava (1985) ont élaboré un test visant à déterminer le caractère aléatoire de séquences, fondé sur la fréquence d'occurrence d'une sous-séquence particulière à deux positions distantes l'une de l'autre d'un nombre fixe de bases. Ils font valoir qu'une "faible probabilité d'occurrence aléatoire justifie une exploration plus approfondie...de...la possibilité d'une signification structurelle ou

fonctionnelle, ...(tandis que s'il y a)...une probabilité élevée d'occurrence aléatoire, il faut faire preuve de prudence avant d'attribuer un quelconque rôle structurel ou fonctionnel à ce genre de...répétition".

Gentleman et coll. (1984) ont donné deux exemples de la manière dont la présence d'une sous-séquence à une fréquence plus élevée que prévu peut renseigner sur la structure ou la fonction : 1) Ce phénomène peut indiquer que le segment d'ADN a été initialement formé par réplication de segments plus petits. Une telle réplication, exacte au début, peut être altérée avec le temps. Toutefois, dans les régions de la séquence où la conservation d'une fonction est nécessaire, des répétitions exactes devraient normalement survenir. 2) Une rupture de l'ADN se produit habituellement à divers endroits, distants de 3 à 10 nucléotides, sur les deux chaînes. Dans ce cas, un vide se crée sur chaque chaîne vis-à-vis des nucléotides qui restent sur l'autre chaîne. Pour combler le vide, des nucléotides complémentaires à leurs vis-à-vis de l'autre chaîne s'ajoutent sur chaque chaîne, ce qui a pour effet de répéter la sous-séquence de l'autre côté de la rupture. Le vide créé par la rupture lui-même est rempli. Par conséquent, la présence de sous-séquences répétées peut indiquer des endroits où il y a eu une insertion dans la séquence d'ADN.

On sait relativement peu de choses sur la fonctionnalité spécifique de l'ADN. En cherchant à identifier les (sous-)séquences de nucléotides qui surviennent de façon plus ou moins aléatoire, on se fonde en partie sur l'hypothèse qu'un degré plus élevé de fonctionnalité correspond à une occurrence moins aléatoire. La complémentarité des deux chaînes de l'ADN permet à chacune, au moment de la division cellulaire, de servir de repère pour la formation de deux structures identiques à double chaîne. Quand l'ADN se reproduit, il peut survenir des mutations aléatoires; l'ADN est donc soumis aux forces de la sélection naturelle et de l'évolution. Ainsi, une configuration particulière qui existe actuellement dans l'ADN peut avoir été favorisée par la sélection naturelle. (Pour plus de détails sur l'évolution génétique, voir Doolittle et Sapienza (198), Orgel et Crick (1980) et Forbes et Shadbolt-Forbes (1988).)

Dans le présent document, on détermine une distribution de probabilité de la fréquence d'occurrence d'une sous-séquence à l'intérieur d'une séquence de nucléotides, dans l'hypothèse où les quatre nucléotides apparaissent au hasard et avec une probabilité égale. Un algorithme général de calcul de cette

distribution est fourni; il dépend de la longueur de la séquence, de la longueur de la sous-séquence et d'une propriété de la sous-séquence que nous appelons "capacité de chevauchement". Des formules explicites sont données pour toutes les sous-séquences de longueur 2 à 8. L'accès à ces distributions permet l'emploi de tests de signification exacts de l'hypothèse d'occurrence aléatoire. Un test appxomitatif est aussi fourni pour les cas où la séquence est longue. Le niveau de signification donné par ces tests mesure le degré d'écart des résultats par rapport à l'hypothèse, c'est-à-dire le degré d'occurrence non aléatoire.

L'hypothèse nulle de la présence équiprobable des différents nucléotides est raisonnable si l'on tient compte du fait que les structures actuelles de l'ADN sont le résultat d'une évolution amorcée à partir d'une "soupe originelle" ou ou d'un "pool de bases" contenant des quantités égales de chaque base. Cet aspect est examiné par Sege et Saxberg (1982), qui fournissent un test statistique pour la comparaison simultanée de plusieurs séquences de nucléotides. L'"hypothèse nulle qu'ils cherchent à rejeter" est que les données observées sont le résultat d'une sélection faite au hasard à même un pool de bases dans lequel les bases A, C, G et T sont présentes à des fréquences relatives spécifiées. Ils décrivent trois possibilités pour le choix des quatre probabilités de l'hypothèse nulle :

> "1) Le pool abstrait de nucléotides est illimité et donc la répartition des nucléotides est effectivement uniforme; 2) les séquences sont tirées d'un pool comportant une distribution de nucléotides caractéristique de l'espèce; ou 3) le pool de nucléotides pour la classe de séquences examinée est bien représenté par la distribution totale des nucléotides dans les séquences elles-mêmes."

Sege et Saxberg décrivent ensuite les conditions dans lesquelles chaque choix convient :

> "Le pool virtuel choisi sera fonction de la question posée par l'expérimentateur et du degré d'information désiré. Les pools virtuels les plus faciles à interpréter sont, évidemment, les pools à probabilités égales (fréquences = 0,25) et les pools virtuels propres à l'espèce/organisme (fréquences moyennes des bases pour l'espèce/organisme). Ces pools virtuels devraient servir de repères à moins que le chercheur ait suffisamment de raisons de croire que le pool observé est d'un autre type

(par ex. pool virtuel expérimental). Lorsque qu'un pool virtuel non standard est utilisé, sa justification et le sens des (niveaux de signification) résultants doivent être soigneusement examinés."

Les distributions exactes établies dans le présent document peuvent servir à tester le premier des choix évoqués par Sege et Saxberg, tandis que le test d'approximation convient à n'importe quel des trois choix.

Certains chercheurs ont présupposé que les quatre types de nucléotides apparaissent de façon indépendante (par ex. ceux que mentionnent Biggins et Cannings (1987, p. 521)), tandis que d'autres en ont fait une hypothèse. Dans ce dernier cas, l'hypothèse a été acceptée dans plusieurs situations, notamment pour l'analyse de (sous-)séquences relativement courtes. Garden (1980) a appliqué des modèles de chaînes de Markov à trois séquences ADN/ARN, et a découvert que les modèles de Markov d'ordre trois, deux et zéro convenaient le mieux. (Dans l'ARN, la pyrimidine uracile apparaît au lieu de la thymine.) Le modèle d'ordre zéro a permis la représentation adéquate d'un gène de longueur 1632. Fuchs (1980) s'est demandé si la longueur de la séquence n'était pas directement liée à l'ordre, citant à l'appui les autres résultats de Garden relatifs aux sous-séquences. Fuchs a noté que "la majorité des segments de 500 nucléotides ont été bien représentées par un modèle d'ordre zéro ou un, comme prévu pour les courtes séquences". Il a recommandé deux types d'analyses supplémentaires : la détection des régions anormales d'une séquence, et l'analyse des écarts entre les fréquences observées et attendues de sous-séquences de nucléotides.

La section 2 ci-après présente une définition du concept de "capacité de chevauchement", une propriété d'une sous-séquence qui complique la détermination de la fonction de probabilité de la fréquence d'occurrence de la sous-séquence. Dans la section 3, on détermine l'espérance et la variance de cette variable aléatoire. La fonction de probabilité - qui est différente pour chaque type de capacité de chevauchement - est calculée à la section 4 (des détails additionnels sont donnés en annexe). La section 5 présente des exemples, portant sur une séquence du génome humain, de l'emploi de la fonction de probabilité, pour des tests de signification exacts et approximatifs de l'occurrence aléatoire.

2. DÉFINITION DE CAPACITÉ DE CHEVAUCHEMENT.

Supposons que les quatre nucléotides formant une sous-séquence surviennent de façon indépendante et avec une probabilité égale, de sorte que la probabilité p d'occurrence d'une sous-séquence de longueur L est de $(1/4)^L$. Soit la variable aléatoire X la fréquence d'occurrence d'une sous-séquence de longueur L à l'intérieur d'une séquence de nucléotides de longueur M. Une sous-séquence "apparaît à la position i" si elle commence à la position i. Dans ce cas, n = M-L+1 est la valeur maximale que peut prendre X. Soit f(x;L,M,Q) la fonction de probabilité de X. Cette fonction dépend non seulement des scalaires L et M, mais aussi du vecteur Q, qui représente la "capacité de chevauchement" de la sous-séquence examinée. Prenons un exemple simple : la sous-séquence AAAA peut apparaître entre 0 et 17 fois dans une séquence de longueur 20, tandis que la sous-séquence ACAC ne peut figurer plus de 9 fois dans une séquence de même longueur, parce que sa capacité de chevauchement est moindre. La sous-séquence ACGT ne possède aucune capacité de chevauchement, sauf dans le cas trivial où elle se superpose à elle-même, de sorte qu'elle ne peut se présenter plus de 5 fois. Par conséquent, f(x;L,M,Q) ne peut être traitée comme une distribution binômiale fondée sur des essais indépendants.

Définissons la capacité de chevauchement de la façon suivante : soit S une sous-séquence donnée et $S_1,S_2,\ldots,S_L$ la représentation de ses L nucléotides de gauche à droite. Définissons alors la capacité de chevauchement Q de S comme une séquence binaire $Q_1,Q_2,\ldots,Q_L$ telle que $Q_i=1$ s'il est possible que les i premières lettres de la sous-séquence chevauchent ses i dernières lettres, et $Q_i=0$ autrement (pour $i=1,\ldots,L$). Plus précisément, $Q_i=1$ si $S_k=S_{k+L-i}$ pour $k=1,\ldots,i$, et $Q_i=0$ autrement (pour $i=1,\ldots,L$). De toute évidence $Q_L=1$ parce qu'une sous-séquence peut toujours se superposer à elle-même. Par exemple, la sous-séquence ACAC a une capacité de chevauchement de 0,1,0,1 et la sous séquence AAAC a une capacité de chevauchement de 0,0,0,1. Il est clair que de nombreuses sous-séquences peuvent avoir la même capacité de chevauchement. Par contre, ce ne sont pas toutes les 2^L séquences binaires possibles de longueur L qui donnent des capacités de chevauchement possibles, en raison des interrelations entre les éléments de Q; par exemple, aucune sous-séquence ne peut avoir une capacité de chevauchement de 1,0,1,1 (parce que $Q_3=1$ signifie que tous les éléments de S sont identiques, tandis que $Q_2=0$ implique l'existence de certaines différences parmi les éléments). Pour L=2 à L=8, par exemple, il y a, respectivement, seulement 2,

3, 4, 6, 8, 10 et 13 capacités de chevauchement possibles. Guibas et Odlyzko (1981) présentent un algorithme servant à tester une séquence binaire pour déterminer si elle constitue une capacité de chevauchement possible. Un algorithme permettant de produire toutes les capacités de chevauchement possibles pour une valeur de L donnée est décrit par Gentleman et Mullin (1987).

Le modèle ci-dessus peut être décrit dans la terminologie des chaînes de Markov. Feller (1950, p. 376, problème 1) a décrit un cas spécial de cette situation (pour L=2 et un alphabet de 2 lettres) sous forme d'un processus de Markov à quatre états, de premier ordre. La généralisation de cette approche donne dans le cas présent un processus de Markov à a^L états, d'ordre (L-1) (où a est le nombre de lettres dans l'alphabet génétique). Alors, en particulier, la probabilité transitoire d'occurrence de S, en supposant que S soit apparue L-k positions avant, est $p^{L-k}Q_k$, pour $k=1,\ldots,L-1$ (où $p=(1/a)^L$). (On peut facilement généraliser encore davantage, pour le cas où les lettres apparaissent avec des probabilités inégales.)

La capacité de chevauchement intervient dans l'analyse de Biggins et Cannings (1987), au sujet d'enzymes de restriction qui coupent les séquences d'ADN lorsque surviennent certaines sous-séquences particulières. Si l'une de ces sous-séquences se chevauche elle-même ou chevauche une autre des sous-séquences reconnaissables, la coupure se fait seulement à la position de l'occurrence "antérieure". Pour d'autres exemples d'analyses incorporant le concept de capacité de chevauchement, voir Shukla et Srivastava (1985) et Karlin et Ost (1987).

3. DÉTERMINATION DE L'ESPÉRANCE ET DE LA VARIANCE

L'espérance de X, contrairement à ce qu'on pourrait penser, est indépendante de la capacité de chevauchement (Q) de la sous-séquence. La variance dépend de Q et, comme on pouvait s'y attendre, est plus élevée dans le cas des sous-séquences qui ont un "plus haut degré" de capacité de chevauchement. Par exemple, si la longueur M de la séquence est égale à 20 et la longueur L de la sous-séquence est égale à 4, alors pour les sous-séquences AAAA, ACAC et ACGT, E(X)=.07 et V(X)=.11, .07 et .06 respectivement.

Pour déterminer l'espérance et la variance de X, supposons que $M \geq L$, et définissons des variables indicatrices $Y_1, Y_2, \ldots, Y_n$ (où n=M-L+1) telles que $Y_i=1$ si la sous-séquence S apparaît à la position i, et $Y_i=0$ dans les autres cas (pour $i=1,\ldots,n$).

On a alors $X = \sum_{i=1}^{n} Y_i$, de sorte que

$E(X) = \sum_{i=1}^{n} E(Y_i)$. Puisque $E(Y_i) = (1/4)^L = p$, $E(X) = np$ et est

indépendante de Q, et

$$V(X) = \sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{n} \mathrm{Cov}(Y_i,Y_j) = \sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{n} E(Y_iY_j) - \sum_{i=1}^{n} E(Y_i) \sum_{j=1}^{n} E(Y_j)$$

$$= \sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{n} E(Y_iY_j) - n^2p^2 \qquad (1).$$

Pour obtenir V(X), il faut tenir compte du fait que les variables Y ne sont pas en général indépendantes l'une de l'autre; les covariances entre des Y qui sont de "proches voisines" dépendent de Q. Pour déterminer ces covariances, des quantités de la forme $E(Y_iY_{i+k})$ doivent être calculées. Il s'agit simplement de la probabilité que la sous-séquence apparaisse tant à la position i qu'à la position i+k. Si $0 \leq k \leq \min(L-1,n-1)$, alors
$E(Y_iY_{i+k}) = Q_{L-k}(1/4)^{L+k} = pQ_{L-k}(1/4)^k$.
Si $\min(L-1,n-1) < k < n$, Q est non pertinent et $E(Y_iY_{i+k}) = (1/4)^{2L} = p^2$.

Il y a n termes parmi les n^2 de $\sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{n} E(Y_i Y_j)$ tels que i=j. En outre, si n>1, il y a 2(n-k) termes tels que j=i+k ou i=j+k (pour k=1,...,min(L-1,n-1)). Si n>L, il y a $2\sum_{k=1}^{n-L} k = (n-L)(n-L+1)$ termes restants qui ne dépendent pas de Q. Par conséquent,

$$\sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{n} E(Y_i Y_j) = np + p^2(n-L)(n-L+1) + 2p\sum_{k=1}^{\min(L-1,\,n-1)} (n-k)Q_{L-k}(1/4)^k,$$

de sorte que l'équation (1) devient

$$V(X) = np(1-np) + p^2(n-L)(n-L+1) + 2p\sum_{k=1}^{\min(L-1,\,n-1)} (n-k)Q_{L-k}(1/4)^k \qquad (2).$$

Du côté droit de l'équation (2) et de l'équation précédente, le second terme est égal à zéro si $n \leq L$, et le troisième terme est égal à zéro si n=1. Si L=1, le troisième terme de l'équation (2) est égal à zéro, et V(X) se réduit, comme il se doit, à la variance np(1-p) d'une variable aléatoire binômiale.

Les formules pour E(X) et V(X) peuvent être généralisées de la façon suivante dans le cas d'un nombre arbitraires de lettres de l'alphabet ayant des occurrences indépendantes selon des probabilités $p_1, p_2, \ldots, p_a$ (dont la somme est égale à 1). Supposons que la sous-séquence S soit formée de L lettres apparaissant avec des probabilités respectives de $p_{j_1}, p_{j_2}, \ldots, p_{j_L}$. Soit $P_k = \prod_{m=1}^{k} p_{j_m}$ le produit des probabilités des k premières lettres de S. En particulier, $P_L = \prod_{m=1}^{L} p_{j_m} = Pr(S)$.

Alors $E(X) = nP_L$, et les équations (1) et (2) peuvent être généralisées en substituant P_L à p et P_K à $(1/4)^k$.

La contribution de Q à V(X) dans l'équation (2) justifie la méthode qui suit pour le classement des sous-séquences dans l'ordre de leur capacité de chevauchement. Soit $\bar{Q}$ le nombre binaire formé des L éléments de Q en ordre inverse. Alors la sous-séquence S_1 dont la capacité de chevauchement est Q_1 a une plus grande capacité de chevauchement que la sous-séquence S_2 dont la capacité de chevauchement est Q_2 si $\bar{Q}_1 > \bar{Q}_2$. Ainsi, par exemple, les sous-séquences suivantes sont présentées en ordre croissant de capacité de chevauchement : ACGTT, ACGTA, ACGAC, AACAA, ACACA, AAAAA (et ont des $\bar{Q}$ respectifs de 10000, 10001, 10010, 10011, 10101, 11111). Selon cette méthode de classement, pour L fixe et $n > 1$, V(X) augmente avec le degré de capacité de chevauchement.

L'examen de l'équation (2) montre que pour $n > L$, la valeur maximale de V(X) (obtenue lorsque tous les éléments de Q sont égaux à 1), est supérieure à la variance np(1-p) d'une variable aléatoire binômiale, et que la valeur minimale de V(X) (obtenue lorsque tous les éléments de Q sauf Q_L sont égaux à 0) est inférieure à np(1-p). Lorsque $n \to \infty$, $V(X) - np(1-p) \to 2np \sum_{k=1}^{L-1} (4^{-k} - p)$ si Q=1,1,...,1, et $V(X) - np(1-p) \to -2(L-1)np^2$ si Q=0,0,...,0,1. Par conséquent, la différence entre la variance maximale et la variance minimale s'approche de $2np \sum_{k=1}^{L-1} 4^{-k}$ lorsque $n \to \infty$. Par exemple, ces trois quantités limites sont

égales, respectivement, à .023n, -.00781n et .0313n pour L=2, et à .00266n, -.0000916n et .00256n pour L=4.

4. DÉTERMINATION DE LA FONCTION DE PROBABILITÉ

À l'aide de la théorie combinatoire, on peut établir une formule algébrique pour la fonction génératrice de X. Cette tâche exige une application appropriée (voir l'annexe) des techniques combinatoires exposées dans Goulden et Jackson (1983, section 2.8). À partir de la fonction génératrice, une formule algébrique pour f(x;L,M,Q), récursive en x et M, peut être obtenue de la manière décrite ci-dessous. Une formule distincte comportant les paramètres L et M est nécessaire pour chaque Q.

La fonction génératrice P(u,v) de f(x;L,M,Q) est

$$P(u,v) = \sum_{M=0}^{\infty} \sum_{x=0}^{\infty} f(x;L,M,Q) u^{M} v^{x}$$

$$= \frac{1-(v-1)h(u/4)}{[1-(v-1)h(u/4)](1-u)-(u/4)^{L}(v-1)} \qquad (3).$$

Cette formule comprend le "polynôme préfixe" h(x), défini comme suit :

$h(x) = \sum_{k=1}^{L-1} x^{L-k} Q_k$. (Il est à remarquer que h(p) est la somme des L-1 probabilités de transition décrites à la section 2.) Dans l'équation (3), le "4" qui apparaît trois fois peut être généralisé au nombre de lettres

équiprobables de l'alphabet. Cette observation vaut aussi pour les équations (4), (5) et (8) ci-dessous.

$f(x;L,M,Q)$ est le coefficient de $u^M v^x$ dans l'équation (3). Pour obtenir une formule pour f, on remplace le dénominateur du membre droit de l'équation (3) par 1-D, où

$$D = u - (u/4)^L + (u/4)^L v - (1-u+uv-v)h(u/4) \qquad (4).$$

On multiplie ensuite les deux membres de l'équation (3) par 1-D et on isole P(u,v) du côté gauche pour obtenir

$$\sum_{M=0}^{\infty}\sum_{x=0}^{\infty} f(x;L,M,Q)u^M v^x = 1-(v-1)h(u/4) + D\sum_{M=0}^{\infty}\sum_{x=0}^{\infty} f(x;L,M,Q)u^M v^x \qquad (5).$$

Si on écrit D sous la forme

$$D = \sum_{i=1}^{L}\sum_{j=0}^{1} C_{ij}u^i v^j$$

de telle sorte que C_{ij} est le coefficient de $u^i v^j$ dans l'équation (4), alors le coefficient de $u^M v^x$ dans l'équation (5) est

$$f(x;L,M,Q) = \sum_{i=1}^{L}\sum_{j=0}^{1} C_{ij}\, f(x-j;L,M-i,Q) \qquad (6).$$

On obtient cette formule en applicant les conditions limites suivantes :

$f(0;L,M,Q) = 1$ si $M < L$;

$f(x;L,M,Q) = 0$ si $M < L$ et $x > 0$ (7).

Les formules générales qui suivent pour les C_{ij}, obtenues en développant et en réarrangeant les termes de l'équation (4), peuvent être utilisées dans l'équation (6) et donner une formule pour f(x;L,M,Q) :

Pour L >1, définissons C_{ij} (i=1,...,L; j=0,1) de la façon suivante :

$$\left.\begin{aligned} C_{1,0} &= (4-Q_{L-1})/4 \\ C_{1,1} &= Q_{L-1}/4 \\ C_{L,0} &= (4Q_1-1)/4^L \\ C_{L,1} &= (1-4Q_1)/4^L = -C_{L,0} \end{aligned}\right\} \quad (8).$$

En outre, si L > 2, on a pour k=1 à L-2 :

$$\left.\begin{aligned} C_{L-k,0} &= (4Q_{k+1}-Q_k)/4^{L-k} \\ C_{L-k,1} &= (Q_k-4Q_{k+1})/4^{L-k} = -C_{L-k,0} \end{aligned}\right\}$$

L'équation (6) est applicable pour M=L,..., ∞ et x=0,...,M-L+1. Si x=0, les termes comportant l'argument x-1 sont nuls. Le tableau 1 donne les formules de f(x;M,L,Q) pour tous les Q possibles entre L=2 et L=8.

Si on utilise la sous-séquence ACA comme exemple (L=3 et Q=1,0,1), les C_{ij} sont les suivants :

$$\begin{aligned} C_{1,0} &= 1 \\ C_{1,1} &= 0 \\ C_{3,0} &= 3/4^3 \\ C_{3,1} &= -3/4^3 \\ C_{2,0} &= -1/4^2 \\ C_{2,1} &= 1/4^2 \end{aligned}$$

Dans ce cas, d'après l'équation (6),

$$f(x;L,M,Q) = f(x;L,M-1,Q) - f(x;L,M-2,Q)/16 + 3f(x;L,M-3,Q)/64$$

$$+ f(x-1;L,M-2,Q)/16 - 3f(x-1;L,M-3,Q)/64,$$

comme au tableau 1.

Les formules obtenues pour f(x;L,M,Q) sont récursives; f(x;L,M,Q) dépend en général de f(x;L,M-i,Q) et de f(x-1;L,M-i,Q) pour i=1,...,L. (La preuve découle de l'équation (3) et du fait qu'aucun terme du polynôme préfixe h(u/4) ne peut être d'un degré supérieur à L-1.) Par conséquent, un programme informatique pour le calcul des valeurs numériques de f(x;L,M,Q) pour x=0 à une limite supérieure J doit stocker un tableau de probabilités de dimensions L x J-L. On peut aussi utiliser un langage de programmation récursif comme le Pascal ou l'Algol. Dans un cas comme dans l'autre, l'initialisation est effectuée d'après les conditions limites de l'équation (7). Un programme en Fortran capable de calculer f(x;L,M,Q), E(X) et V(X) pour des valeurs données de L, M et de la sous-séquence peut être obtenu auprès des auteurs.

L'équation (6) est valable pour la distribution binômiale (c.-à-d. pour L=1 et Q=1) si $C_{1,0} = 3/4$ et $C_{1,1} = 1/4$, ce qui donne la formule de récursion

$$f(x;L,M,Q) = 3f(x;L,M-1,Q)/4 + f(x-1;L,M-1,Q)/4 \qquad (9).$$

On remarquera, à l'examen de l'équation (8), que si $L>1$, le seul cas où $C_{1,0} = 3/4$ et $C_{1,1} = 1/4$ survient lorsque Q_{L-1}, et alors $Q_1=Q_2=\ldots=Q_{L-2}=1$, de sorte que tous les autres C_{ij} dans l'équation (6) sont non nuls.

Le tableau 2 présente les valeurs de $f(x;4,20,Q)$ pour les trois sous-séquences AAAA, ACAC et ACGT, choisies en tant que sous-séquences ayant un degré respectif "élevé", "moyen" et "faible" de capacité de chevauchement.

5. EXEMPLES D'EMPLOI DE LA FONCTION DE PROBABILITÉ DANS DES TESTS DE SIGNIFICATION EXACTS ET APPROXIMATIFS

La connaissance des formules pour f(x;L,M,Q) permet d'exécuter des tests de signification exacts de l'hypothèse d'occurrence aléatoire, et les formules pour E(X) et V(X) fournissent les valeurs nécessaires à un test approximatif. On utilisera, à titre d'exemple, une séquence de 825 nucléotides obtenue de la base de données de séquences nucléiques du Centre médical de l'Université de Georgetown (voir tableau 3). Cette séquence est décrite dans Dayhoff et coll. (1983) comme un "fragment de génome modérément répétitif (famille Alu) - humain (longueur 825)". Ce matériel intergénique est l'une des 14 séquences examinées dans Gentleman et coll. (1984).

La sous-séquence CC figure 67 fois dans ce fragment de génome. En vertu de l'hypothèse, sa fréquence d'occurrence dans une séquence de longueur 825 a une espérance de 51.50 et une variance de 67.57. Le tableau 4 montre les probabilités et les probabilités cumulatives pour les fréquences entre 30 et 70. (L'étendue complète est de 0 à 824.) À l'aide de ces probabilités, on peut calculer le niveau de signification relatif à un test exact de l'hypothèse en faisant la somme des probabilités pour les fréquences ≥ 67, plus la somme des probabilités pour les fréquences ≤ 36 (soit toutes les fréquences ayant des probabilités inférieures ou égales à Pr(67)). On obtient donc comme niveau de signification .039 + .028 = .067.

En déterminant les fréquences qui se trouvent le plus près possible des points .025 et .975 de cette distribution discrète, on obtient un intervalle de confiance à 95 %; sa borne inférieure se situe entre 35 et 36, tandis que sa borne supérieure se trouve entre 67 et 68.

Le test approximatif du Khi carré pour la vérification de l'ajustement, d'usage courant, a parfois été utilisé pour comparer les fréquences observées et attendues des sous-séquences. (Par exemple, Smith et coll. (1983) ont appliqué ce test aux fréquences attendues en se fondant sur la composition en bases de la séquence globale.) Le test de vérification de l'ajustement consiste à faire la somme des différences au carré redressées entre les fréquences observées et attendues. Dans le présent exemple, les deux fréquences observées sont 67 (nombre d'occurrences de CC) et 757 (nombre d'occurrences d'autres sous-séquences de longueur deux). La valeur résultante de la statistique de test est de 4.976, de sorte que le niveau de signification approché pour ce test serait normalement donné par $Pr(\chi^2_1 \geq 4.976) = .0257$,

soit une valeur considérablement plus faible que la valeur exacte de .0670. Toutefois, le test de vérification de l'ajusterent ne convient pas dans ce cas, étant donné les différences, qui demeurent même lorsque $n \to \infty$, entre $f(x;L,M,Q)$ et la distribution binômiale (comme on l'a vu aux sections 3 et 4); lorsqu'il n'y a que deux fréquences observées, la statistique du test de vérification de l'ajustement équivaut au carré d'une fréquence binômiale (n,p) observée normalisée.

On peut obtenir une statistique de test approchée en normalisant la fréquence observée d'une sous-séquence au moyen de la variance exacte (telle que donnée par l'équation (2)), c.-à-d. en utilisant $T^* = (x-np)^2/V(X)$ au lieu de $T = (x-np)^2/[np(1-p)]$. Le théorème de la limite centrale pour des essais dépendants peut alors être invoqué (par ex. comme dans Feller (1950), p. 374 et dans Shukla et Srivastava (1985)) et on peut utiliser une approximation de χ^2_1 pour n suffisamment grand. Dans le cas des x=67 occurrences de la sous-séquence CC, T^*=3.5556, ce qui donne un niveau de signification approché beaucoup plus précis de $Pr(\chi^2_1 \geq 3.5556) = .0594$. (Notons que T^* peut être utilisé dans le cas plus général d'un alphabet de a lettres avec des probabilités qui ne sont pas nécessairement égales.)

Si l'on examine la sous-séquence plus longue CCCC, on relève une fréquence observée de 6. L'espérance et la variance de la distribution exacte sont de 3.21 et de 5.23 respectivement. Le niveau de signification exact est de .153, et le niveau de signification approché obtenu avec T^* est de .223. (Le niveau de signification approché obtenu avec T serait de .119.) Dans ce cas, le test d'approximation n'est pas exact; l'approximation du Khi carré se fonde sur des fréquences attendues de grandeur cinq ou plus, car $f(x;L,M,Q)$ affiche alors une plus grande symétrie.

On peut donc voir que, pour n fixe, le test d'approximation est moins susceptible d'être utilisable pour une longue sous-séquence que pour une courte, car E(X) diminue à mesure que L s'accroît. Par chance, le calcul d'un niveau de signification exact est considérablement plus rapide (et donc moins coûteux) pour une valeur élevée de L que pour une valeur faible; les queues inférieure et supérieure de la distribution sont toutes deux requises pour la calcul de la probabilité critique (valeur P) dans le cas d'un test bilatéral, et lorsque E(X) est relativement faible, un moins grand nombre de valeurs de $f(x;L,M,Q)$ ont besoin d'être calculées récursivement avant qu'on n'atteigne la queue supérieure.

La séquence TTTTTT se présente deux fois au tableau 3. Le nombre attendu d'occurences est de .20 et la variance est de .33. Le niveau de signification pour le test exact est .042. Puisque la fréquence attendue est si faible, il n'y a pas lieu d'utiliser un test d'approximation. (Si on le faisait, le niveau de signification résultant serait de .00181 pour T^* et de .00006 pour T.)

Comme dernier exemple, considérons les sous-séquences TTGTTT et AAACAA, qui apparaissent six et cinq fois respectivement. Ces sous-séquences sont le complément inversé l'une de l'autre; chacune est formée des nucléotides complémentaires de l'autre, en ordre inverse. Chacune survient beaucoup plus souvent qu'on s'y attendrait; les niveaux de signification exacts respectifs sont de $.12 \times 10^{-6}$ et de $.31 \times 10^{-5}$. L'examen attentif de l'emplacement des occurrences de ces sous-séquences révèle que les six occurrences de TTGTTT sont voisines (commençant aux positions 773, 778, 785, 789 et 797), et que quatre des cinq occurrences de AAACAA sont voisines (positions 355, 361, 375 et 387). Les deux groupements de sous-séquences sont distants d'un peu plus de 400 nucléotides dans la séquence globale. Il est possible, par conséquent, que la séquence ait une superstructure en boucle, stabilisée par la liaison de deux régions distantes d'environ 400 nucléotides.

6. REMARQUES EN GUISE DE CONCLUSION

Dans le présent document, nous avons élaboré certaines formules et montré comment on pourrait en établir d'autres, au besoin, pour calculer les moyennes, les variances et les probabilités dans le cas de distributions de fréquence de sous-séquences de nucléotides. On peut effectuer des tests de signification exacts et calculer des intervalles de confiance, ou encore utiliser un test d'approximation, pour analyser les structures d'occurrences non aléatoires dans des séquences ou des sous-séquences de nucléotides. Ces moyens peuvent aider les chercheurs à mieux connaître la structure et la fonctionnalité des (sous-)séquences. Les méthodes exactes sont particulièrement utiles lorsque la fréquence attendue d'une sous-séquence ou la longueur de la séquence est si faible qu'un test d'approximation ne peut être utilisé. Par contre, le text d'approximation peut servir dans le cas plus général où les lettres de l'alphabet génétique ont des probabilités d'apparition hypothétiques qui ne sont pas nécessairement égales.

Les niveaux de signification tirés de ces tests peuvent aussi servir à comparer deux séquences ou plus, de la façon suivante : pour une sous-séquence donnée S, on effectue le test de signification pour chaque séquence et on compare les probabilités critiques, c'est-à-dire les écarts des séquences par rapport à une hypothèse nulle commune. La comparaison des probabilités critiques au lieu des fréquences observées permet de comparer des séquences de longueurs différentes, ce qui évite les problèmes d'alignement. On peut aussi de cette façon comparer les résultats relatifs à des sous-séquences ayant des longueurs ou des capacités de chevauchement différentes, car la probabilité critique est normalisée selon la distribution de fréquence propre à chaque sous-séquence.

Au moment de faire l'analyse des structures à l'intérieur d'une séquence, il est naturel de répéter ces tests pour plusieurs sous-séquences; l'analyste doit alors tenir compte des mises en garde habituelles touchant les comparaisons multiples. Une méthode possible, selon Daniel (1959), consisterait à utiliser une courbe de probabilité χ_1^2 (ou semi-normale ou normale) pour analyser les valeurs multiples de la statistique T^* du test d'approximation (ou sa racine carrée, ou sa racine carrée avec signe, respectivement).

Lorsqu'il est utile d'évaluer le degré d'écart par rapport au cas aléatoire, ces concepts et méthodes peuvent aussi s'appliquer à l'analyse de séquences d'acides aminés dans les protéines, et dans d'autres domaines que la biologie moléculaire, par ex. dans l'analyse des séries chronologiques et la cryptographie.

Il serait utile, dans des recherches futures, que les formules des distributions de fréquence soient généralisées au cas de probabilités inégales d'occurrence des différentes lettres de l'alphabet.

7. REMERCIEMENTS

Les auteurs désirent remercier W.F. Forbes et M.A. Shadbolt-Forbes de l'Université de Waterloo, dont les travaux ont servi d'inspiration au travail présenté ici, et qui ont fourni d'abondantes informations scientifiques. Nous remercions également les évaluateurs pour les suggestions très utiles qu'ils ont faites, et Audrey Sirois de Statistique Canada qui a réalisé avec soin la dactylographie de cet exposé mathématique.

8. RÉFÉRENCES

Aquadro, Charles F. et Greenberg, Barry D. (1983). Human Mitochondrial DNA Variation and Evolution: Analysis of Nucleotide Sequences from Seven Individuals. Genetics, 103, 287-312.

Biggins, J.D. et Cannings, C. (1987). Markov Renewal Processes, Counters and Repeated Sequences in Markov Chains. Adv. Appl. Prob., 19, 521-545.

Daniel, C. (1959). Use of Half-Normal Plots in Interpreting Factorial Two-Level Experiments. Technometrics, 1, 311-341.

Dayhoff, M.O., Chen, H.R., Hunt, L.T., Barker, W.C., Yeh, L.-S., George, D.G. et Orcutt, B.C. (1983). Nucleic Acid Sequence Database, user's manual for June 1983 Release, National Biomedical Research Foundation, Document NASD-0683C, Georgetown Univ. Medical Center.

Doolittle, W. Ford et Sapienza, Carmen (1980). Selfish Genes, the Phenotype Paradigm and Genome Evolution. Nature, 284, 601-603.

Feller, William (1950). An introduction to Probabiliaty Theory and Its Applications. Volume I. Second Edition. Wiley, New York.

Forbes, W.F. et Shadbolt-Forbes, M.A. (1988). The Role of Pattern Analysis of DNA. Présenté à la ASA Winter Conference on Statistics in Biotechnology, San Antonio.

Fuchs, Camil (1980). On the Distribution of the Nucleotides in Seven Completely Sequenced DNAs. Gene, 10, 371-373.

Garden, Peter W. (1980). Markov Analysis of Viral DNA/RNA Sequences. Journal of Theoritical Biology, 82, 679-684.

Gentleman, Jane F. et Mullin, Ronald C. (1986). The Distribution of the Frequency of Occurrence of Nucleotide Substrings, Based on Their Overlap Capability. COMPSTAT 86, Short Communications and posters, Rome, Italie, 97-98.

Gentleman, Jane F. et Mullin, Ronald C. (1987). Algorithms for Calculating the Distribution of the Frequency of Occurrence of Nucleotide Substrings. Manuscrit non publié.

Gentleman, J.F., Shadbolt-Forbes, M.A., Hawkins, J.W., Ladik, J et Forbes, W.F. (1984). Problems of Pattern Recognition in Nucleotide Sequences. Math. Scientist, 9, 125-139.

Goulden, Ian P. et Jackson, David M. (1983). Combinatorial Enumeration. Wiley Ineerscience, New York.

Grantham, R., Gautier, C., Gouy, M., Jacobzone, M. et Mercier, R. (1981). Codon Catalog Usage is a Genome Strategy Modulated for Gene Expressivity. Nucleic Acids Research, 9, r43-r74.

Guibus, L.J. et Odlyzko, A.M. (1981). Periods in Strings. Journal of Combinatorial Theory, Series A, 30, 19-42.

Gjyton, Arthur C. (1969). Function of the Human Body, 3e édition. W.B. Saunders, Philadelphie, London, Toronto.

Harr, Robert, Haggstrom, Mikael et Gustafsson, Petter (1983). Search Algorithm for Pattern Match Analysis of Nucleic Acid Sequences. Nucleic Acids Research, 11, 2943-2957.

Karlin, Samuel et Ost, Friedemann (1987). Counts of Long Aligned Word Matches Among Random Letter Sequences. Adv. Appl. Prob., 19, 293-351.

Korn, Laurence Jay et Queen, Cary (1984). Analysis of Biological Sequences on Small Computers. DNA, 3, 421-436.

Maizel, Jacob V., Jr. et Lenk, Robert P. (1981) Enhanced Graphic Matrix Analysis of Nucleic Acid and Protein Sequences. Proceedings of the National Academy of Science USA, 78, 7665-7669.

Nussinov, R. (1984). Doublet frequencies in evolutionary distinct groups. Nucleic Acids Research, 12, 1749-1763.

Orgel, L.E. et Crick, F.H.C. (1980). Selfish DNA: The Ultimate Parasite. Nature, 284, 604-607.

Queen, Cary L. et Korn, Laurence Jay (1980). Computer Analysis of Nucleic Acids and Proteins. Methods in Enzymology, 65, 595-609.

Sadler, J.R., Waterman, M.S. et Smith, T.F. (1983). Regulatory Pattern Identification in Nucleic Acid Sequences. Nucleic Acids Research, 11, 2221-2231.

Sege, Robert D. et Saxberg, Bo E.H. (1982). A Statistical Test for Comparing Several Nucleotide Sequences. Nucleic Acids Research, 10, 375-389.

Shukla, Rakesh et Srivastava, R.C. (1985). The Statistical Analysis of Direct Repeats in Nucleic Acid Sequences. J. Appl. Prob., 22, 15-24.

Smith, Temple F. et Burks, Christian (1983). Searching for Sequence Similarities. Nature, 301, 194.

Smith, T.F., Waterman, M.S. et Sadler, J.R. (1983). Statistical Characterization of Nucleic Acid Sequence Functional Domains. Nucleic Acids Research, 11, 2205-2220.

Vass, J. Keith et Wilson, Richard H. (1984). 'ZSTATS' - A Statistical Analysis for Potential Z-DNA Sequences. Nucleic Acids Research, 12, 825-832.

Weir, B.S. (1985). Statistical Analysis of Molecular Genetic Data. IMA J. Mathematics Applied in Medicine & Biology, 2, 1-39.

TABLEAU 1: Formules pour f(x;L,M,Q),
tous les Q possibles pour L=2 à L=8

Afin d'abréger la notation, f(x;L,M,Q) est dénoté a(M,x).
Les formules s'appliquent pour M=L et x=0,M-L+1.
Si x=0, les termes comportant l'argument x-1 sont égaux à zéro.

L=2:

Q=0,1 (e.g., S=AC)

$$a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-2,x)/16 + a(M-2,x-1)/16$$

Q=1,1 (e.g., S=AA)

$$a(M,x) = 3a(M-1,x)/4 + 3a(M-2,x)/16 + a(M-1,x-1)/4 - 3a(M-2,x-1)/16$$

L=3:

Q=0,0,1 (e.g., S=ACC)

$$a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-3,x)/64 + a(M-3,x-1)/64$$

Q=1,0,1 (e.g., S=ACA)

$$a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-2,x)/16 + 3a(M-3,x)/64 + a(M-2,x-1)/16 - 3a(M-3,x-1)/64$$

Q=1,1,1 (e.g., S=AAA)

$$a(M,x) = 3a(M-1,x)/4 + 3a(M-2,x)/16 + 3a(M-3,x)/64 + a(M-1,x-1)/4 - 3a(M-2,x-1)/16 - 3a(M-3,x-1)/64$$

L=4:

Q=0,0,0,1 (e.g., S=ACGT)

$$a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-4,x)/256 + a(M-4,x-1)/256$$

Q=0,1,0,1 (e.g., S=ACAC)

$$a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-2,x)/16 + a(M-3,x)/16 - a(M-4,x)/256 + a(M-2,x-1)/16 - a(M-3,x-1)/16 + a(M-4,x-1)/256$$

Q=1,0,0,1 (e.g., S=ACGA)

$$a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-3,x)/64 + 3a(M-4,x)/256 + a(M-3,x-1)/64 - 3a(M-4,x-1)/256$$

Q=1,1,1,1 (e.g., S=AAAA)

$$a(M,x) = 3a(M-1,x)/4 + 3a(M-2,x)/16 + 3a(M-3,x)/64 + 3a(M-4,x)/256 + a(M-1,x-1)/4 - 3a(M-2,x-1)/16 - 3a(M-3,x-1)/64 - 3a(M-4,x-1)/256$$

L=5:

Q=0,0,0,0,1 (e.g., S=ACGTT)

$$a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-5,x)/1024 + a(M-5,x-1)/1024$$

Q=0,1,0,0,1 (e.g., S=ACGAC)

$$a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-3,x)/64 + a(M-4,x)/64 - a(M-5,x)/1024 + a(M-3,x-1)/64 - a(M-4,x-1)/64 + a(M-5,x-1)/1024$$

Q=1,0,0,0,1 (e.g., S=ACGTA)

$$a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-4,x)/256 + 3a(M-5,x)/1024 + a(M-4,x-1)/256 - 3a(M-5,x-1)/1024$$

Q=1,0,1,0,1 (e.g., S=ACACA)
a(M,x) = a(M-1,x)
- a(M-2,x)/16 + a(M-3,x)/16
- a(M-4,x)/256
+ 3a(M-5,x)/1024
+ a(M-2,x-1)/16 - a(M-3,x-1)/16
+ a(M-4,x-1)/256 - 3a(M-5,x-1)/1024

Q=1,1,0,0,1 (e.g., S=AACAA)
a(M,x) = a(M-1,x)
- a(M-3,x)/64
+ 3a(M-4,x)/256 + 3a(M-5,x)/1024
+ a(M-3,x-1)/64
- 3a(M-4,x-1)/256 - 3a(M-5,x-1)/1024

Q=1,1,1,1,1 (e.g., S=AAAAA)
a(M,x) = 3a(M-1,x)/4
+ 3a(M-2,x)/16
+ 3a(M-3,x)/64
+ 3a(M-4,x)/256 + 3a(M-5,x)/1024
+ a(M-1,x-1)/4
- 3a(M-2,x-1)/16
- 3a(M-3,x-1)/64
- 3a(M-4,x-1)/256 - 3a(M-5,x-1)/1024

L=6:

Q=0,0,0,0,0,1 (e.g., S=ACGTAG)
a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-6,x)/4096
+ a(M-6,x-1)/4096

Q=0,0,1,0,0,1 (e.g., S=ACGACG)
a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-3,x)/64 + a(M-4,x)/64
- a(M-6,x)/4096
+ a(M-3,x-1)/64 - a(M-4,x-1)/64
+ a(M-6,x-1)/4096

Q=0,1,0,0,0,1 (e.g., S=ACCCAC)
a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-4,x)/256 + a(M-5,x)/256
- a(M-6,x)/4096
+ a(M-4,x-1)/256 - a(M-5,x-1)/256
+ a(M-6,x-1)/4096

Q=0,1,0,1,0,1 (e.g., S=ACACAC)
a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-2,x)/16 + a(M-3,x)/16
- a(M-4,x)/256 + a(M-5,x)/256
- a(M-6,x)/4096
+ a(M-2,x-1)/16 - a(M-3,x-1)/16
+ a(M-4,x-1)/256 - a(M-5,x-1)/256
+ a(M-6,x-1)/4096

Q=1,0,0,0,0,1 (e.g., S=ACGTCA)
a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-5,x)/1024 + 3a(M-6,x)/4096
+ a(M-5,x-1)/1024 - 3a(M-6,x-1)/4096

Q=1,0,1,0,0,1 (e.g., S=ACAACA)
a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-3,x)/64 + a(M-4,x)/64
- a(M-5,x)/1024 + 3a(M-6,x)/4096
+ a(M-3,x-1)/64 - a(M-4,x-1)/64
+ a(M-5,x-1)/1024 - 3a(M-6,x-1)/4096

Q=1,1,0,0,0,1 (e.g., S=AAGTAA)
a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-4,x)/256 + 3a(M-5,x)/1024
+ 3a(M-6,x)/4096
+ a(M-4,x-1)/256 - 3a(M-5,x-1)/1024
- 3a(M-6,x-1)/4096

Q=1,1,1,1,1,1 (e.g., S=AAAAAA)
a(M,x) = 3a(M-1,x)/4
+ 3a(M-2,x)/16
+ 3a(M-3,x)/64
+ 3a(M-4,x)/256
+ 3a(M-5,x)/1024 + 3a(M-6,x)/4096
+ a(M-1,x-1)/4
- 3a(M-2,x-1)/16
- 3a(M-3,x-1)/64
- 3a(M-4,x-1)/256
- 3a(M-5,x-1)/1024 - 3a(M-6,x-1)/4096

L=7:

Q=0,0,0,0,0,0,1 (e.g., S=ACGTACA)

$$a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-7,x)/16384 + a(M-7,x-1)/16384$$

Q=0,0,1,0,0,0,1 (e.g., S=ACGTACG)

$$a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-4,x)/256 + a(M-5,x)/256 - a(M-7,x)/16384 + a(M-4,x-1)/256 - a(M-5,x-1)/256 + a(M-7,x-1)/16384$$

Q=0,1,0,0,0,0,1 (e.g., S=ACGTTAC)

$$a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-5,x)/1024 + a(M-6,x)/1024 - a(M-7,x)/16384 + a(M-5,x-1)/1024 - a(M-6,x-1)/1024 + a(M-7,x-1)/16384$$

Q=1,0,0,0,0,0,1 (e.g., S=ACGTACA)

$$a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-6,x)/4096 + 3a(M-7,x)/16384 + a(M-6,x-1)/4096 - 3a(M-7,x-1)/16384$$

Q=1,0,0,1,0,0,1 (e.g., S=ACGACGA)

$$a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-3,x)/64 + a(M-4,x)/64 - a(M-6,x)/4096 + 3a(M-7,x)/16384 + a(M-3,x-1)/64 - a(M-4,x-1)/64 + a(M-6,x-1)/4096 - 3a(M-7,x-1)/16384$$

Q=1,0,1,0,0,0,1 (e.g., S=ACAAACA)

$$a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-4,x)/256 + a(M-5,x)/256 - a(M-6,x)/4096 + 3a(M-7,x)/16384 + a(M-4,x-1)/256 - a(M-5,x-1)/256 + a(M-6,x-1)/4096 - 3a(M-7,x-1)/16384$$

Q=1,0,1,0,1,0,1 (e.g., S=ACACACA)

$$a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-2,x)/16 + a(M-3,x)/16 - a(M-4,x)/256 + a(M-5,x)/256 - a(M-6,x)/4096 + 3a(M-7,x)/16384 + a(M-2,x-1)/16 - a(M-3,x-1)/16 + a(M-4,x-1)/256 - a(M-5,x-1)/256 + a(M-6,x-1)/4096 - 3a(M-7,x-1)/16384$$

Q=1,1,0,0,0,0,1 (e.g., S=AACCCAA)

$$a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-5,x)/1024 + 3a(M-6,x)/4096 + 3a(M-7,x)/16384 + a(M-5,x-1)/1024 - 3a(M-6,x-1)/4096 - 3a(M-7,x-1)/16384$$

Q=1,1,1,0,0,0,1 (e.g., S=AAACAAA)

$$a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-4,x)/256 + 3a(M-5,x)/1024 + 3a(M-6,x)/4096 + 3a(M-7,x)/16384 + a(M-4,x-1)/256 - 3a(M-5,x-1)/1024 - 3a(M-6,x-1)/4096 - 3a(M-7,x-1)/16384$$

```
Q=1,1,1,1,1,1,1,1 (e.g., S=AAAAAAA)
  a(M,x) = 3a(M-1,x)/4
         + 3a(M-2,x)/16
         + 3a(M-3,x)/64
         + 3a(M-4,x)/256
         + 3a(M-5,x)/1024 + 3a(M-6,x)/4096
         + 3a(M-7,x)/16384
         + a(M-1,x-1)/4
         - 3a(M-2,x-1)/16
         - 3a(M-3,x-1)/64
         - 3a(M-4,x-1)/256
         - 3a(M-5,x-1)/1024 - 3a(M-6,x-1)/4096
         - 3a(M-7,x-1)/16384

L=8:

Q=0,0,0,0,0,0,0,1 (e.g., S=ACGTGGTC)
  a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-8,x)/65536
         + a(M-8,x-1)/65536

Q=0,0,0,1,0,0,0,1 (e.g., S=ACGTACGT)
  a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-4,x)/256 + a(M-5,x)/256
         - a(M-8,x)/65536
         + a(M-4,x-1)/256 - a(M-5,x-1)/256
         + a(M-8,x-1)/65536

Q=0,0,1,0,0,0,0,1 (e.g., S=ACGTTACG)
  a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-5,x)/1024 + a(M-6,x)/1024
         - a(M-8,x)/65536
         + a(M-5,x-1)/1024 - a(M-6,x-1)/1024 + a(M-8,x-1)/65536

Q=0,1,0,0,0,0,0,1 (e.g., S=ACGTGTAC)
  a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-6,x)/4096 + a(M-7,x)/4096
         - a(M-8,x)/65536
         + a(M-6,x-1)/4096 - a(M-7,x-1)/4096 + a(M-8,x-1)/65536

Q=0,1,0,0,1,0,0,1 (e.g., S=ACGACGAC)
  a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-3,x)/64 + a(M-4,x)/64
         - a(M-6,x)/4096 + a(M-7,x)/4096
         - a(M-8,x)/65536
         + a(M-3,x-1)/64 - a(M-4,x-1)/64
         + a(M-6,x-1)/4096 - a(M-7,x-1)/4096
         + a(M-8,x-1)/65536

Q=0,1,0,1,0,1,0,1 (e.g., S=ACACACAC)
  a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-2,x)/16 + a(M-3,x)/16
         - a(M-4,x)/256 + a(M-5,x)/256 - a(M-6,x)/4096
         + a(M-7,x)/4096
         - a(M-8,x)/65536
         + a(M-2,x-1)/16 - a(M-3,x-1)/16
         + a(M-4,x-1)/256 - a(M-5,x-1)/256 + a(M-6,x-1)/4096
         - a(M-7,x-1)/4096
         + a(M-8,x-1)/65536

Q=1,0,0,0,0,0,0,1 (e.g., S=ACCCCCCA)
  a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-7,x)/16384 + 3a(M-8,x)/65536
         + a(M-7,x-1)/16384 - 3a(M-8,x-1)/65536

Q=1,0,0,1,0,0,0,1 (e.g., S=ACGAACGA)
  a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-4,x)/256 + a(M-5,x)/256
         - a(M-7,x)/16384 + 3a(M-8,x)/65536
         + a(M-4,x-1)/256 - a(M-5,x-1)/256
         + a(M-7,x-1)/16384
         - 3a(M-8,x-1)/65536

Q=1,0,1,0,0,0,0,1 (e.g., S=ACAGGACA)
  a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-5,x)/1024 + a(M-6,x)/1024
         - a(M-7,x)/16384 + 3a(M-8,x)/65536
         + a(M-5,x-1)/1024 - a(M-6,x-1)/1024
         + a(M-7,x-1)/16384 - 3a(M-8,x-1)/65536

Q=1,1,0,0,0,0,0,1 (e.g., S=AACCCCAA)
  a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-6,x)/4096 + 3a(M-7,x)/16384
         + 3a(M-8,x)/65536
         + a(M-6,x-1)/4096 - 3a(M-7,x-1)/16384
         - 3a(M-8,x-1)/65536
```

Q=1,1,0,0,1,0,0,1 (e.g., S=AAGAAGAA)

$$a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-3,x)/64 + a(M-4,x)/64 - a(M-6,x)/4096 + 3a(M-7,x)/16384 + 3a(M-8,x)/65536 + a(M-3,x-1)/64 - a(M-4,x-1)/64 + a(M-6,x-1)/4096 - 3a(M-7,x-1)/16384 - 3a(M-8,x-1)/65536$$

Q=1,1,1,0,0,0,0,1 (e.g., S=AAACGAAA)

$$a(M,x) = a(M-1,x) - a(M-5,x)/1024 + 3a(M-6,x)/4096 + 3a(M-7,x)/16384 + 3a(M-8,x)/65536 + a(M-5,x-1)/1024 - 3a(M-6,x-1)/4096 - 3a(M-7,x-1)/16384 - 3a(M-8,x-1)/65536$$

Q=1,1,1,1,1,1,1,1 (e.g., S=AAAAAAAA)

$$a(M,x) = 3a(M-1,x)/4 + 3a(M-2,x)/16 + 3a(M-3,x)/64 + 3a(M-4,x)/256 + 3a(M-5,x)/1024 + 3a(M-6,x)/4096 + 3a(M-7,x)/16384 + 3a(M-8,x)/65536 + a(M-1,x-1)/4 - 3a(M-2,x-1)/16 - 3a(M-3,x-1)/64 - 3a(M-4,x-1)/256 - 3a(M-5,x-1)/1024 - 3a(M-6,x-1)/4096 - 3a(M-7,x-1)/16384 - 3a(M-8,x-1)/65536$$

TABLEAU 2: Valeurs de f(x;4,20,Q), E(X) et V(X)
pour Q = 1,1,1,1; 0,1,0,1; et 0,0,0,1
(par ex. pour les sous-séquences AAAA, ACAC et ACGT)

FRÉQUENCE	PROBABILITÉ AAAA	ACAC	ACGT
0	0.9499E 00	0.9383E 00	0.9350E 00
1	0.3772E-01	0.5723E-01	0.6366E-01
2	0.9351E-02	0.4156E-02	0.1359E-02
3	0.2288E-02	0.2653E-03	0.9770E-05
4	0.5527E-03	0.1509E-04	0.1629E-07
5	0.1318E-03	0.7665E-06	0.9095E-12
6	0.3099E-04	0.3442E-07	0.
7	0.7190E-05	0.1334E-08	0.
8	0.1643E-05	0.4184E-10	0.
9	0.3698E-06	0.9095E-12	0.
10	0.8175E-07	0.	0.
11	0.1773E-07	0.	0.
12	0.3757E-08	0.	0.
13	0.7749E-09	0.	0.
14	0.1528E-09	0.	0.
15	0.3001E-10	0.	0.
16	0.5457E-11	0.	0.
17	0.9095E-12	0.	0.
E(X)	.06641	.06641	.06641
V(X)	.10506	.07210	.06477

TABLEAU 3: **Exemple de séquence de nucléotides : Fragment de génome modérément répétitif (famille Alu) - humain. Longueur 825. Tiré de la base de données sur les séquences d'acides nucléiques du Centre médical de l'Université de Georgetown.**

POSITION	NUCLÉOTIDES
1- 50	CTCGAGGGAGGAGCCCGGGGCTGGGGTACGGAGGCCTCTGCACATCTTAG
51-100	AGTAAAACAAGCAGGAGAGGCTGGGTGCGGTGGCTCATGCCTATAATCCC
101-150	AGCACTTTAGGAGGCTGAGGCGGGCAGATCACCTGAGGTCGGGAGTTCAA
151-200	GACCAGCCTGACCAACAGGGAGAAACCCCATCTTTACTAAAACTACAAAA
201-250	TTAGCTGGGTGTGGTGGCACATGCCTGTAATCCCAGATATTCGGGAGGCT
251-300	GAGGCAGGAGAATCGCTTGAACCTGGGAAGCAGAGGTTGCGCTGAGCCGA
301-350	GATGGCACCATTGCACTCCAGCCTGGGCAACGAGAGCGAAACTCCGTCTC
351-400	AAAAAAACAAAAACAAAAAAATCAAAACAATCAAAAAAACAAGCAGGAGG
401-450	GGCTCTGAGGTGCCTGCAACACCCAGGTACAATCCGTGGCCCTGAGGCCC
451-500	ATCACAGGGAAGGGGTCTTTGCAGCTCTTTCAACCCCCAGCCCAGCATCC
501-550	AAGGAAGCCCAGGGCAGGGAGAAACCTCAGCTGCACCATCAGAGCTCAGA
551-600	ACAGAGAAGGCAGAAATTAGCAGGGAGTGGGGCTGGGGAGGCTTCCTAGA
601-650	AGACGTGTCTCCCGCCTTGCTGGCACTGAGGCCTTGAGGATGGGTCCATA
651-700	CTGGGCCCCCACTGCCAGGGATGCAGATCCGGCCCACTGCTGAAATCTGT
701-750	GCTCCTGGAGCCTCCCTCCTGTTCATGGGCCACAGGCTGTGAAAACCCCA
751-800	GAGTCCTCCCAGGCAGCAAGTTTTGTTTTGTTTTTTGTTTGTTTGCTTGT
801-825	TTGTTTTTTGAGAGTCTGCTCGTCA

TABLEAU 4: Valeurs de f(x;2,825,Q), E(X) et V(X) pour Q = 1,1 et x=30,70 (par ex. pour la sous-séquence CC)

FRÉQUENCE	PROBABILITÉ	PROBABILITÉ CUMULATIVE
30	0.0010	0.0028
31	0.0016	0.0044
32	0.0023	0.0066
33	0.0032	0.0098
34	0.0044	0.0142
35	0.0059	0.0202
36	0.0078	0.0280
37	0.0101	0.0381
38	0.0128	0.0509
39	0.0158	0.0667
40	0.0191	0.0858
41	0.0227	0.1085
42	0.0265	0.1350
43	0.0303	0.1654
44	0.0341	0.1995
45	0.0377	0.2372
46	0.0409	0.2781
47	0.0437	0.3219
48	0.0460	0.3678
49	0.0476	0.4154
50	0.0484	0.4638
51	0.0486	0.5124
52	0.0481	0.5605
53	0.0468	0.6074
54	0.0450	0.6524
55	0.0427	0.6950
56	0.0399	0.7349
57	0.0368	0.7717
58	0.0335	0.8053
59	0.0302	0.8354
60	0.0268	0.8622
61	0.0235	0.8857
62	0.0204	0.9061
63	0.0175	0.9235
64	0.0148	0.9383
65	0.0124	0.9507
66	0.0103	0.9610
67	0.0084	0.9694
68	0.0068	0.9762
69	0.0055	0.9816
70	0.0043	0.9860
E(X)	51.50	
V(X)	67.57	

ANNEXE

Détermination de la fonction génératrice P(u,v)

Soit $P(u,v) = \sum_{M=0}^{\infty} \sum_{x=0}^{\infty} a_{M,x}\, u^M v^x$, où $a_{M,x}$ est la probabilité de x occurrences d'une chaîne donnée S de longueur L et de capacité de chevauchement Q dans une chaîne de longueur M. La méthode consiste à créer une fonction génératrice qui compte les x occurrences de S sous forme d'une sous-chaîne, puis à convertir le résultat en une fonction génératrice de probabilité. Le développement présenté ici est une application du processus exposé dans Goulden et Jackson (1983, section 2.8), que l'on restreint au cas spécial d'une seule sous-chaîne identifiée et que l'on applique à un alphabet N formé de n symboles.

Soit S une chaîne non nulle de longueur L. Une grappe de longueur M et d'indice T est une chaîne C comprenant un sous-ensemble identifié de membres $s_{k_1}, s_{k_2}, \ldots, s_{k_t}$ et un ensemble identifié de sous-chaînes $T_1, T_2, \ldots, T_t$ qui ont les propriétés suivantes :

(1) Chaque T_i est la chaîne S;

(2) Le symbole s_{k_i} est le premier membre de T_i;

(3) L'indice k_1 est 1 et l'indice k_t est M-L+1, c.-à-d. que les premiers et les derniers L symboles de C sont des sous-chaînes identifiées;

(4) Deux sous-chaînes consécutives se chevauchent;

(5) Tout élément de C figure dans au moins un T_i.

Notons qu'il n'est pas nécessaire que chaque sous-chaîne de C qui est identique à S soit identifiée. Par exemple, si S = ACACAC, la chaîne ACACACACACAC représente une grappe de longueur 12 et d'indice 3, où les sous-chaînes identifiées commencent à la première, à la troisième et à la septième

position. Il y a une chaîne identique à S qui commence à la cinquième position, mais elle n'est ni identifiée ni prise en compte dans le compte de l'indice.

Pour introduire l'information relative au chevauchement, on se sert du polynôme préfixe. Un préfixe d'une chaîne S est une chaîne non nulle P pour laquelle il existe des chaînes non nulles X et Y telles que S = PX = YP. Soit $\{n_1, n_2, \ldots, n_u\}$ l'ensemble des longueurs de préfixe dans S. Le polynome préfixe est alors $h(x) = \sum_{i=1}^{u} x^{n_i}$. Il est à remarquer que cette définition correspond à celle donnée à la section 4.

Notons que toute grappe C d'indice t peut être décomposée de façon unique en un ensemble ordonné de t-1 préfixes et une copie de S, chaque préfixe commençant par un élément identifié et se terminant juste avant l'apparition suivante de cet élément. Pour la grappe donnée ci-dessus, la décomposition est AC,ACAC,ACACAC. Inversement, un tel ensemble ordonné produit une grappe unique d'indice t si l'on procède dans le sens contraire.

Soit $c_{M,t}$ le nombre de grappes de longueur M et d'indice t associées à la chaîne S. La fonction génératrice des grappes C(u,v) pour S est ainsi définie :

$$C(u,v) = \sum_{M=0}^{\infty} \sum_{t=0}^{\infty} c_{M,t}\, u^M v^t.$$

Dans l'exposé qui suit, nous tenons compte du fait que la fonction génératrice d'une collection ordonnée d'objets est le produit des fonctions génératrices des objets; autrement dit, si A et B sont des collections d'objets ayant des fonctions génératrices respectives $\underline{A}$ et $\underline{B}$, la fonction génératrice de la collection d'objets (a,b) où $a \in A$ et $b \in B$ est $\underline{A}\,\underline{B}$. Pour plus de détails, voir Goulden et Jackson (1983).

Lemme. Soit S une chaîne de longueur L ayant le polynôme préfixe h(x). La fonction génératrice des grappes pour S est alors :

$$C(u,v) = u^L v/(1-vh(u)).$$

Preuve. Comme on l'a signalé ci-dessus, une grappe d'indice t peut être décomposée en une collection ordonnée de t-1 préfixes et une copie de S. La fonction génératrice est $u^L v$ pour $\{S\}$ et vh(u) pour les préfixes, de sorte que la fonction génératrice pour les grappes de poids t est

$$(vh(u))^{t-1}u^L v.$$

La sommation sur toutes les valeurs de t donne

$$C(u,v) = u^L v \sum_{t=1}^{\infty} (vh(u))^{t-1}$$

$$= u^L v/(1-vh(u))$$

soit le résultat recherché.

Pour obtenir la fonction génératrice propre au nombre d'occurrences de S sous forme d'une sous-chaîne de toutes les chaînes de longueur M provenant de N, il est utile de faire intervenir des chaînes indicées. Une chaîne indicée T de longueur M et d'indice t (par rapport à une chaîne de longueur L) est une chaîne de longueur M comportant un sous-ensemble identifié d'éléments $^{s}k_1, ^{s}k_2, \ldots, ^{s}k_t$ et un ensemble identifié de sous-chaînes $T_1, T_2, \ldots, T_t$ ayant les propriétés suivantes :

(1) Chaque T_i est la chaîne S;

(2) $^{s}k_i$ est le premier élément de T_i.

Il est à noter que contrairement aux grappes, il n'est pas nécessaire que la premières ou la dernière chaîne de longueur L soit une copie de S, ni que chaque élément apparaisse dans une chaîne identifiée. De plus, les sous-ensembles identifiés adjacents n'ont pas à se chevaucher.

Soit $d_{M,t}$ le nombre de chaînes indicées de longueur M et d'indice T par rapport à S. La fonction génératrice des chaînes indicées pour S est alors

$$D(u,v) = \sum_{M=0}^{\infty} \sum_{t=0}^{\infty} d_{M,t}\, u^M v^t.$$

Lemme. Soit S une chaîne de longueur L avec fonction génératrice de grappes C(u,v). La fonction génératrice des chaînes indicées pour S est alors

$$D(u,v) = (1-nu-C(u,v))^{-1}$$

où n est le nombre de symboles de l'alphabet.

Comme les grappes, les ensembles indicés peuvent être décomposés de façon unique en collections ordonnées; un membre de la collection, cette fois, est soit un élément unique provenant de N, soit une grappe. Pour obtenir la décomposition, il faut procéder du début à la fin, c.-à-d. examiner chaque caractère en le traitant comme un membre unique de la collection ordonnée jusqu'à ce qu'on rencontre un élément identifié s_{k_i}. Il s'agira du début d'une grappe unique, qui devient alors un membre de la collection. L'examen se poursuit jusqu'à ce qu'on arrive à la fin. Inversement, toute collection ordonnée d'éléments et de grappes uniques produit une séquence indicée correspondante unique. Comme il y a n symboles dans l'alphabet, la fonction génératrice propre à l'ensemble des membres pour chaque position dans la collection est nu+C(u,v), et la fonction génératrice pour toutes les collections de longueur w est $(nu+C(u,v))^w$. On obtient le résultat en faisant la somme sur tous les w.

Notons que l'introduction de symboles entre les grappes lors de la création d'ensembles indicés peut produire des copies additionnelles de S (qui ne sont pas identifiées dans la grappe). En outre, il peut y avoir des copies non identifiées de S à l'intérieur des grappes elles-mêmes. Soit T une chaîne de longueur M provenant de N qui contient précisément k sous-chaînes

identiques à S. Si l'on regarde comment sont construites les chaînes indicées, on constate que T est compté dans D(x,y) exactement une fois pour chaque sous-ensemble des k copies de S. Autrement dit, D(x,y) est une fonction génératrice de type "au moins" pour l'ensemble de chaînes compté selon le nombre de copies de S qu'il contient, d'après le principe d'inclusion et d'exclusion (voir, par exemple, Goulden et Jackson (1983)).

Dans le contexte des fonctions génératrices, le principe d'inclusion et d'exclusion stipule que si f(z) est la fonction génératrice pour le nombre d'objets qui contiennent "au moins" k propriétés (au sens ci-dessus), alors la fonction génératrice g(z) pour le nombre d'objets ayant exactement k propriétés est donnée par $g(z) = f(z-1)$. Par conséquent, si $f_{M,x}$ est le nombre de chaînes de longueur M provenant de N qui contiennent exactement x sous-chaînes identiques à S, et si

$$F(u,v) = \sum_{M=0}^{\infty} \sum_{x=0}^{\infty} f_{M,x}\, u^M v^x,$$

alors

$$F(u,v) = (1-nu-C(u,v-1))^{-1}.$$

Il y a n^M séquences possibles de longueur M, de sorte que pour obtenir la fonction génératrice de probabilité P(u,v), on remplace u par u/n dans F(u,v). En particulier, si n = 4, on a

$$P(u,v) = \frac{1-(v-1)h(u/4)}{[1-(v-1)h(u/4)](1-u)-(u/4)^L(v-1)}$$

comme dans la section 4.

DIRECTION DES ÉTUDES ANALYTIQUES

DOCUMENTS DE RECHERCHE

No .

1. RÉACTION COMPORTEMENTALE DANS LE CONTEXTE D'UNE SIMULATION MICRO-ANALYTIQUE SOCIO-ÉCONOMIQUE par Lars Osberg

2. CHÔMAGE ET FORMATION par Garnett Picot

3. DES PENSIONS AUX PERSONNES AU FOYER ET LEUR RÉPARTITION SUR LA DURÉE DU CYCLE DE VIE par Michael Wolfson

4. LA MODÉLISATION DES PROFILS D'EMPLOI DES CANADIENS AU COURS DE LEUR EXISTENCE par Garnett Picot

5. PERTE D'UN EMPLOI ET ADAPTATION AU MARCHÉ DU TRAVAIL DANS L'ÉCONOMIE CANADIENNE par Garnett Picot et Ted Wannell

6. SYSTÈME DE STATISTIQUES RELATIVES À LA SANTÉ: PROPOSITION D'UN NOUVEAU CADRE THÉORIQUE VISANT L'INTÉGRATION DE DONNÉES RELATIVES À LA SANTÉ par Michael Wolfson

7. PROJET PILOTE DE RACCORDEMENT MICRO-MACRO POUR LE SECTEUR DES MÉNAGES AU CANADA par Hans Adler et Michael Wolfson

8. NOTES SUR LES GROUPEMENTS DE SOCIÉTÉ ET L'IMPÔT SUR LE REVENU AU CANADA par Michael Wolfson

9. L'EXPANSION DE LA CLASSE MOYENNE: DONNÉES CANADIENNES SUR LE DÉBAT SUR LA DÉQUALIFICATION par John Myles

10. LA MONTÉE DES CONGLOMÉRATS par Jorge Niosi

11. ANALYSE ÉNERGÉTIQUE DU COMMERCE EXTÉRIEUR CANADIEN. 1971 et 1976 par K.E. Hamilton

12. TAUX NETS ET BRUTS DE CONCENTRATION DES TERRES par Ray D. Bollman et Philip Ehrensaft

13. TABLE DE MORTALITÉ EN L'ABSENCE D'UNE CAUSE POUR LE CANADA (1921 À 1981): Une méthode d'analyse de transition épidémiologique par Dhruva Nagnur et Michael Nagrodski

14. DISTRIBUTION DE LA FRÉQUENCE D'OCCURENCE DES SOUS-SÉQUENCES DE NUCLÉOTIDES, D'APRÈS LEUR CAPACITÉ DE CHEVAUCHEMENT par Jane F. Gentleman et Ronald C. Mullin

15. IMMIGRATION ET LE CARACTÈRE ETHNOLINGUISTIQUE DU CANADA ET DU QUÉBEC par Réjean Lachapelle

16. INTÉGRATION DE LA FERME AU MARCHÉ EXTÉRIEUR ET TRAVAIL HORS FERME DES MEMBRES DES MÉNAGES AGRICOLES par Ray D. Bollman et Pamela Smith

Pour de plus amples renseignements, s'adresser au Président, Comité d'études des publications, Direction des études analytiques, Édifice R.H. Coats, 24ième étage, Statistique Canada, Parc Tunney's, Ottawa, Ontario K1A 0T6.